

10/532423

PCT/JP 03/11861

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

17.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年10月23日  
Date of Application:

REC'D 06 NOV 2003

出願番号 特願2002-308884  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2002-308884]

WFO PCT

出願人 株式会社東北テクノアーチ  
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

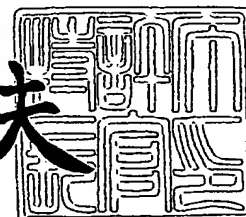
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENTPRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年10月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 AB02029

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県塩釜市袖野田町 2 4 - 2 0

    【氏名】 阿部 敬悦

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘 2 - 1 1 - 7

    【氏名】 五味 勝也

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区三条町 2 0 - 2 - 4 3

    【氏名】 山形 洋平

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区台原 6 - 5 - 1 2 - 1 0 5

    【氏名】 長谷川 史彦

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区北山 2 - 1 1 - 1 1 レストファミ  
        ール 2 0 3

    【氏名】 前田 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区加茂 2 - 9 - 1

    【氏名】 中島 佑

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 独立行政法人産業技術  
        総合研究所 つくばセンター内

    【氏名】 町田 雅之

## 【特許出願人】

【持分】 090/100

【識別番号】 899000035

【氏名又は名称】 株式会社 東北テクノアーチ

## 【特許出願人】

【持分】 010/100

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

## 【代理人】

【識別番号】 100100181

【弁理士】

【氏名又は名称】 阿部 正博

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053419

【納付金額】 18,900円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 90/100

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0213557

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物によるプラスチックの分解を利用した有用物質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プラスチックにアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤを接触させ、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤの作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法。

【請求項 2】 プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解し、更に、分解されたプラスチックの成分を微生物により有用物質に転換することから成る、プラスチックから有用物質を製造する方法。

【請求項 3】 有用物質が、タンパク質、一次代謝産物、二次代謝産物、及びバイオサーファクタントから成る群から選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 有用物質が菌体外に分泌される物質であることを特徴とする、請求項 2 ないし 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 有用物質の生合成系に関与する酵素をコードする遺伝子によって組換えられ、該酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項 2 ないし 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を共存させることにより、プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項 1 ないし 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を反応系の外部より添加して、プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子によって組換えられ、界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子が構成的発現プロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項 8 に

記載の方法。

【請求項 10】 界面活性物質及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子が誘導型発現プロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】 界面活性物質としてバイオサーファクタントを用いることを特徴とする、請求項 6 ないし 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】 バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素の共存下で、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法。

【請求項 13】 バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を反応系の外部より添加して、プラスチックの分解を促進することを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子によって組換えられ、バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を高発現する形質転換菌を使用することを特徴とする、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】 バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を構成的発現プロモーターの制御下で発現させることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を誘導型発現プロモーターの制御下で発現させることを特徴とする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】 アスペルギルス属カビ由来のバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を用いることを特徴とする、請求項 11 ないし 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】 アスペルギルス属カビがアスペルギルス・オリゼであることを特徴とする、請求項 17 に記載の分解方法。

【請求項 19】 プラスチック分解酵素がエステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、セリンハイドロラーゼ、及びそれらの混合

物から成る群から選択されることを特徴とする、請求項6ないし18のいずれか一項に記載の分解方法。

【請求項20】 バイオサーファクタントとしてハイドロホービン、プラスチック分解酵素としてクチナーゼを用いることを特徴とする、請求項11ないし19のいずれか一項に記載の分解方法。

【請求項21】 プラスチックが生分解性プラスチックである、請求項1ないし20のいずれか一項に記載の分解方法。

【請求項22】 プラスチックがポリエステル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ナイロン、ポリスチレン、デンプン、及びそれらの混合物から成る群から選択されることを特徴とする、請求項21に記載の分解方法。

【請求項23】 ポリエステルがポリブチレンサクシネート、ポリ乳酸、脂肪族ポリエステル、及びポリカプロラクトンから成る群から選択されることを特徴とする、請求項22に記載の分解方法。

【請求項24】 微生物が糸状性細菌であることを特徴とする、請求項2ないし23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】 糸状性細菌が放線菌であることを特徴とする、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 放線菌がストレプトマイセス属であることを特徴とする、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 ストレプトマイセス属がストレプトマイセス・グリゼウスまたはストレプトマイセス・セリカラーであることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 微生物が真核糸状真菌であることを特徴とする、請求項2ないし23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】 真核糸状真菌がアスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属、リゾプス属、及びムコール属から成る群から選択されることを特徴とする、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 アスペルギルス属微生物が、アスペルギルス・オリゼ、ア

スベルギルス・ソーヤ、アスベルギルス・ニガー、アスベルギルス・アワモリ、アスベルギルス・カワチ、アスベルギルス・ニドゥランス、アスベルギルス・タマリ及びアスベルギルス・レペンスから成る群から選択されることを特徴とする、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】 液体培養系において、プラスチックに微生物を接触させることを特徴とする、請求項 1 ないし 30 のいずれか一項に記載の分解方法。

【請求項 32】 固体培養系において、プラスチックにアスベルギルス・オリゼを接触させることを特徴とする、請求項 1 ないし 30 のいずれか一項に記載の分解方法。

【請求項 33】 界面活性物質をコードする遺伝子を含む DNA、プラスチック分解酵素をコードする遺伝子を含む DNA、及び有用物質をコードする遺伝子を含む DNA から選択される少なくとも一つ以上の DNA によって組換えられた形質転換菌。

【請求項 34】 界面活性物質がアスベルギルス・オリゼ由来のハイドロホービンである、請求項 33 記載の形質転換菌。

【請求項 35】 プラスチック分解酵素がアスベルギルス・オリゼ由来のクチナーゼである、請求項 33 記載の形質転換菌。

【請求項 36】 界面活性物質がアスベルギルス・オリゼ由来のハイドロホービンであり、プラスチック分解酵素がアスベルギルス・オリゼ由来のクチナーゼであり、且つ、有用物質が  $\alpha$ -アミラーゼである、請求項 33 記載の形質転換菌。

【請求項 37】 アスベルギルス属微生物である、請求項 33 ないし 36 のいずれか一項に記載の形質転換菌。

【請求項 38】 アスベルギルス・オリゼ由来であることを特徴とする、請求項 37 に記載の形質転換菌。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、プラスチック、特に生分解性プラスチックに微生物を接触させ、プ

プラスチックを分解する過程で、プラスチック中の炭素を微生物により新たな有用物質に転換する生産技術に関するものである。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

日本のプラスチックの需要量は、1997年の統計によれば1400～1500万トンに達し、そのうち900万トン以上が廃棄プラスチックとして排出されており、環境問題及び化石燃料の消費抑制の観点から対応が必要とされている（社団法人プラスチック処理協会発行「プラスチックリサイクルの基礎知識」）。その対策として、石油化学系プラスチックの焼却による炭酸ガスおよびダイオキシン類の発生と、非分解性プラスチックの環境への廃棄の抑制を目的に、生分解性プラスチックが開発されてきた。生分解性プラスチックは、2010年には全プラスチックの約3-7%、すなわち50-100万トン/年の流通量が予測されているが（「生分解性ポリマーの市場拡大シナリオ」株式会社富士キメラ総研版、23頁）、現状の技術である生分解性プラスチックの自然土壤中における分解処理許容量の限界と生分解性プラスチック自身のコスト高が問題として指摘されている。

#### 【0003】

ところで、糸状菌の中でも、特にアスペルギウス・オリゼ（キコウジ菌）等を含む麹菌は、清酒、みそ、醤油、及び、みりん等を製造する、わが国における醸造産業において古くから利用され、直接に食されてきた菌類であり、米国のFDA（食品医薬局）によりGRAS（Generally Recognized as Safe）にリストアップされている安全な遺伝子源である。

#### 【0004】

更に、麹菌は、蛋白質などを菌体外に分泌する能力に優れており、その為に、様々な有用物質の生産に利用されている。

#### 【0005】

特許文献1には、微生物として放線菌の一種であるアミコラトプシス・メディテラーネイHT-6を用いてポリブチレンサクシネート系樹脂を分解する方法が記載されている。

#### 【0006】



特許文献2には、リパーゼ及びクチナーゼ等の酵素を用いる生分解性ポリマーの酵素分解方法が記載されている。

#### 【0007】

これらの方法ではバイオサーファクタントを反応系に共存されることについては何等開示されていない。又、プラスチック分解成分以外の有用物質を製造することについても何等教示されていない。

#### 【0008】

##### 【特許文献1】

特開平9-25271号公報

##### 【特許文献2】

特表2001-512504号公報

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

現状の生分解性プラスチック分解技術は土壤中での微生物によるプラスチックの水と二酸化炭素への単純な分解を前提としており、有用付加価値物質への転換を前提にはしていない。この状況は国内外を問わず同じである。現在の生分解性プラスチックは従来の石油化学系プラスチックに比較してコスト高（3～5倍）であり（「'01生分解性ポリマーの現状と新展開」株式会社ダイヤリサーチマーテック、株式会社中央リサーチセンター版 513-521頁）、コストダウンあるいは何らかのコスト回収技術が求められている。

#### 【0010】

更に、生分解性プラスチックの土壌埋め立てによる分解は、もっぱら地表近く（深さ30～50cm程度）のみで行なわれているが、元来土壌中の菌密度は少なく、深い部分に至ってはさらに菌密度が低下することから、自然界における土壌中の分解速度は遅い。したがって、生分解性プラスチックの需要が予測通りに拡大した場合、大量に廃棄されるプラスチック負荷を土壌中での分解で賄いきるのは不可能である。さらに、国土の狭い日本においては広大な埋め立て分解地の確保が困難であり、廃棄量の多い都市近郊では特に問題となる。現在は包装材・農業資材・コンポスト対応包材が先行しているが、今後、自動車内装部品、コンピ

ユータ・家電包材など大量消費財への生分解性プラスチックの利用が進展した場合、生分解性プラスチックの高密度処理施設が必要となる。生分解性ポリマー使用に関する問題点としても各種アンケート結果によれば、コスト高と同時に大量処理施設のインフラ整備が指摘されている(「'01生分解性ポリマーの現状と新展開」株式会社ダイヤリサーチマーテック, 株式会社中央リサーチセンター版 513-521頁)。

#### 【0011】

これらの課題に対して、本発明者らは鋭意研究した結果、全く新しいコンセプトとして、バイオサーファクタントのような界面活性物質とプラスチック分解酵素を生産する微生物あるいは界面活性物質及びプラスチック分解酵素そのものを活用することで、高密度のプラスチックの大規模分解を効率的に進行させることに加えて、酵素タンパク質や抗生物質などの有用物質生産性の高い微生物(糸状菌や放線菌)を用いることによって、有用物質の生産も同時に行うことができる新規な方法を発明するにいたった。

#### 【0012】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、第一の態様として、プラスチックにアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤを接触させ、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤの作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法に係る。

#### 【0013】

本発明は、第二の態様として、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解し、更に、分解されたプラスチックの成分を微生物により有用物質に転換することから成る、プラスチックから有用物質を製造する方法に係る。

#### 【0014】

この方法は、プラスチック廃材を微生物の発酵基質として分解しつつ、付加価値の高い有用物質(酵素・医薬品・化成品など)の生産に転換する新たな分解・物質生産が可能な循環再生システムとして有用である。

## 【0015】

ここで、有用物質の種類に特に制限はなく、当業者に公知の任意の物質を包含するが、例えば、有用物質の生合成系に関与する酵素等のタンパク質、一次代謝産物（有機酸等）、二次代謝産物（抗生物質及び化成品前駆体等）、及びバイオサーファクトント等を挙げることが出来る。特に、有用物質が菌体外に分泌される物質である場合には、製造した後の精製等の操作が容易となり、効率及び経済性の点で有利である。又、プラスチックが分解されたときに得られるモノマー及びオリゴマーもプラスチック再生のための原料として有用であるので、有用物質に含めることが出来る。

## 【0016】

プラスチックを分解する微生物と、分解されたプラスチックの成分を有用物質に転換する微生物とは、同一であってもよいし、夫々別の種類の微生物でも良い。

## 【0017】

分解されたプラスチックの成分を有用物質に転換する為に使用する微生物としては、例えば、紫外線照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）等の薬剤による突然変異処理で得ることが出来、有用物質を高発現する変異株を挙げることが出来る。更に、以下に記載するような、有用物質の生合成系に関与する酵素等の各種の有用物質をコードする遺伝子によって組換えられ、該酵素を高発現する形質転換菌を使用することが好ましい。

## 【0018】

更に本発明は、第三の態様として、バイオサーファクトント及び／又はプラスチック分解酵素の共存下で、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法に係る。

## 【0019】

以上の本発明の各態様で使用する、プラスチックを分解する能力、又は、分解されたプラスチックを転換して有用物質を産生する能力を有する微生物の代表例として、糸状性細菌及び真核糸状真菌を挙げることが出来る。

## 【0020】

糸状性細菌の例としてはストレプトマイセス属等の放線菌がある。更に、ストレプトマイセス属のストレプトマイセス・グリゼウスまたはストレプトマイセス・セリカラーを挙げる事が出来る。

## 【0021】

一方、真核糸状真菌としては、アスペルギウス(Aspergillus)属、ペニシリウム(Penicillium)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、リゾプス(Rhizopus)属、ムコール(Mucor)属、フミコーラ(Humicola)属、及びフザリウム(Fusarium)属を挙げる事が出来る。アスペルギルス(Aspergillus)属には、アスペルギルス・オリゼ(Aspergillus oryzae)、アスペルギルス・ソーヤ(Aspergillus sojae)、及びアスペルギルス・ニドランス(Aspergillus nidulans)等が含まれる。

## 【0022】

この中で、アスペルギルス・オリゼRIB40株(FERM P-18273)は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1)に平成13年3月28日付けで寄託されている。

## 【0023】

更に、上記の糸状性細菌及び真核糸状真菌等から当業者に公知の遺伝子工学的手法によって得られる各種形質転換菌も本発明で有利に使用することが出来る。

## 【0024】

即ち、本発明のハイドロホービン等の界面活性物質若しくはバイオサーファクタントをコードする遺伝子を含むDNA、クチナーゼ等のプラスチック分解酵素をコードする遺伝子を含むDNA、及び、有用物質(例えば、有用物質の生合成に関与する酵素である $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼ、及びフェノールオキシダーゼなど)をコードする遺伝子を含むDNAから選択される少なくとも一つ以上のDNAによって組換えられた形質転換菌を挙げる事が出来る。これらの形質転換菌は、該界面活性物質を高発現し、プラスチック分解酵素を高発現し、又は有用物質の生合成に関与する酵素を高発現することが可能である。

従って、本発明は、第四の態様としてこのような各種形質転換菌にも係るものである。

#### 【0025】

このような形質転換菌を作成する元となる微生物の例として、上記の微生物以外に、アスペルギルス属であるアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシテイクス (*Aspergillus parasiticus*)、アスペルギルス・ノミウス (*Aspergillus nomius*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamari*) 及びアスペルギルス・レペンス (*Aspergillus repens*) 等を挙げることが出来る。

#### 【0026】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の第一、第二及び第三の各態様において、界面活性物質若しくはバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を培養系に共存させることにより、プラスチックの分解を促進することが出来る。例えば、それらの物質を培養系の外部より添加することにより、これらの物質を共存させることが可能である。添加の量及び割合・添加の時期等の諸条件は当業者が適宜選択することが出来る。これらの物質は必ずしも同時に添加する必要はなく、方法の各段階で逐次的に添加することも可能である。

#### 【0027】

プラスチックは疎水的な表面構造を有しているため、通常は水溶液中の低分子栄養素を転換して生育する微生物はプラスチック表面には接触が困難であり、そのことが生分解性プラスチックの分解を妨げている。しかしながら、本発明にあつては、界面活性物質若しくはバイオサーファクタントを反応系に共存させることにより、微生物のプラスチックへの接触を増強することが出来、プラスチックの分解効率を促進させることが出来る。

#### 【0028】

既に記載したように、本発明方法においては、界面活性物質若しくはバイオサ

ーファクタント、プラスチック分解酵素、及び／又は有用物質を高発現する形質転換菌を使用することによって、プラスチックを分解し、分解されたプラスチックを有用物質に転換することをより促進することが可能となる。

#### 【0029】

本発明方法においては、上記各物質をコードする遺伝子を夫々別の微生物に導入して、こうして得られた複数種類の形質転換菌を用いて反応させることができる。即ち、界面活性物質若しくはバイオサーファクタントをコードする遺伝子によって組換えられた形質転換菌、プラスチック分解酵素をコードする遺伝子によって組換えられ形質転換菌、及び、有用物質遺伝子によって組換えられ形質転換菌のうちの任意の組み合わせからなる複数の形質転換菌を使用することによって本発明の各方法を実施することができる。

#### 【0030】

尚、本発明の形質転換菌において導入される、界面活性物質若しくはバイオサーファクタント、プラスチック分解酵素、又は有用物質をコードする遺伝子は一種類とは限らず、夫々、複数種類の界面活性物質の遺伝子、複数種類のプラスチック分解酵素の遺伝子、又は複数種類の有用物質の遺伝子で組換えることも可能である。

#### 【0031】

或いは、同一の微生物を界面活性物質若しくはバイオサーファクタント及びプラスチック分解酵素をコードする双方の遺伝子によって組換えられ、この両物質が同時に高発現される形質転換菌を使用することが出来る。その結果、プラスチック分解酵素を生産する微生物菌体がプラスチック表面により強く吸着して、プラスチック分解酵素を生産することからプラスチック分解が促進される。

#### 【0032】

こうして得られたプラスチックを分解する能力のある形質転換菌と有用物質生産用の微生物の2種類の微生物を共存させて培養することによって有用物質の製造を行うことも可能である。

#### 【0033】

更に、こうして得られた形質転換菌を元の菌株として使用して、既に記載した

ように、有用物質を高発現する変異株、又は、有用物質をコードする遺伝子によって組換えられこれらの物質を高発現する形質転換菌を作成することによって、プラスチック分解能を高めた微生物に有用酵素の遺伝子を導入して高発現させることが可能となり、こうして得られる一種類の形質転換菌を使用することによって、プラスチックを分解すると同時に有用物質の生産を効率よく行わせることができる。

#### 【0034】

本発明において、複数種類の微生物を使用する場合には、これら複数種類の微生物を同時に培養する共培養系で実施したり、又は、本発明方法が夫々分解反応及び転換反応を担う複数の連続的な培養段階から構成されており、その各段階において、夫々前の段階で得られた培養液に更に異なる微生物を逐次的に作用させて処理することも可能である。

#### 【0035】

又、以上のような各種形質転換菌を使用した場合でも、更に、界面活性物質若しくはバイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素を、例えば外部より添加することによって反応系に共存させ、プラスチックの分解及び転換を更に効率化することも可能である。

#### 【0036】

界面活性物質としては、当業者に公知の任意の物質を使用することが出来る。しかしながら、生物、特に、微生物が細胞表面又は菌体外に生産する生物系界面活性物質であるバイオサーファクタントが環境面等の点で好ましい。

#### 【0037】

バイオサーファクタント（菌体プラスチック吸着因子）としては当業者に公知の任意の物質を使用することが出来るが例えば、リン脂質や親水性の糖と疎水性の脂肪酸が結合しているグリコリピド等が知られている。例えば、ハイドロホービン、マンノシルエリスリトールリピッド及びラムノリピッド等の糖脂質エステル、環状リポペプチド、環状ポリペプチド、並びに、サーファクチン等の両親媒性タンパク質等を挙げることが出来る。更に、取得源となる微生物の種類に特に制限はないが、例えば、アスペルギルス・オリゼ等のアスペルギルス属カビ由来

のバイオサーファクタントであるを挙げることが出来る。

#### 【0038】

一方、本発明方法で使用するプラスチック分解酵素も当業者に公知の任意のものを使用することが出来る。例えば、エステラーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、及びセリンハイドロラーゼ等から選択される少なくとも一種を使用することが出来る。プラスチック分解酵素も、例えば、アスペルギルス・オリゼ等のアスペルギルス属カビに代表される各種微生物由来のものを使用することが出来る。

#### 【0039】

従って、例えば、バイオサーファクタントとしてアスペルギルス・オリゼ由来の hidroホービン、プラスチック分解酵素としてアスペルギルス・オリゼ由来のクチナーゼを使用することが出来る。

#### 【0040】

本発明方法で分解の対象となるプラスチックに、特に制限はない。その代表例として、「生分解性プラスチック」として知られているものを挙げることが出来る。

#### 【0041】

生分解性プラスチックとは、「使用状態ではその使用目的において必要とされる十分な機能を保ち、廃棄されたときには土中又は水中の微生物の働きによって、より単純な分子レベルにまで分解されるプラスチック」ともいうべき物質である。分解の程度に基づいて、「完全分解型生分解性プラスチック」と「部分分解（崩壊）型生分解性プラスチック」とに分けられ、更に、材料及び製造方法からは、「微生物生産系」、「天然高分子系」及び「化学合成系」に大きく分けることが出来る。本発明方法では、これらのいずれの種類の生分解性プラスチックも使用することが出来る。

#### 【0042】

従って、本発明方法において用いられるプラスチックの具体例は、例えば、ポリエステル、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ナイロン、ポリスチレン、デンプン、及びそれらの混合物から成る群から選択される。更に、



ポリエステルとしては、ポリブチレンサクシネート、ポリ乳酸、脂肪族ポリエステル、ポリカプロラクトンそれらの混合物から成る群から選択される。

#### 【0043】

本発明の微生物を利用してプラスチックを分解する方法、及び、プラスチックから有用物質を製造する方法において、分解反応及び転換反応は、プラスチック乳化液を含む液体培養系及びプラスチック固型ペレット又はプラスチック粉体等を使用する固体培養系等の当業者に公知の任意の培養系において行うことが出来る。

#### 【0044】

従って、分解の対象となるプラスチックは、固型ペレット状及び乳化液等の、夫々の培養系に応じた任意の形態をとることが出来る。培養液及び培地等の組成、並びに、温度、pH等の各種培養温度条件は、プラスチック及び使用する微生物の種類等に応じて当業者が適宜選択することが出来る。

#### 【0045】

本発明で使用するアスペルギルス・オリゼ由来のハイドロホービン遺伝子の具体例として、以下の(a)又は(b)ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA:

(a) 配列番号: 1で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) (a)で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列からなりハイドロホービンと実質的に同等の機能を有するポリペプチド、を挙げることが出来る。

別の具体例として、以下の(a)又は(b)のDNA:

(a) 配列番号: 1で示される塩基配列又はその部分配列を含むDNA、(b) (a)の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAと実質的に同等の機能を有するDNA、を挙げることが出来る。

#### 【0046】

ここで、ポリペプチドの「機能」とは、それが細胞(菌体)の内部及び/又は外部において示す生物学的機能又は活性を意味する。更に、「実質的に同等」と

は、それらの示す機能（活性）が程度の差はあるものの細胞（菌体）の内部及び／又は外部における機能として同等であると見做し得るものであることを示す。

#### 【0047】

本発明DNAは当業者に公知の方法で調製することが出来る。例えば、寄託されている菌株から実施例で記載した方法によって容易にクローニングすることが出来る。或は、本明細書に記載された本発明DNAの塩基配列又はアミノ酸産配列の情報に基づき、当業者に周知の化学合成、又は、本発明のプライマーを使用したPCRにより増幅して調製することも出来る。

#### 【0048】

本明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、各塩基配列間の相同性の程度が、例えば、全体の平均で約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上であるような、高い相同性を有する塩基配列間のみで、特異的にハイブリッドが形成されるような条件を意味する。具体的には、例えば、温度60℃～68℃において、ナトリウム濃度150～900mM、好ましくは600～900mM、pH 6～8であるような条件を挙げることが出来る。

#### 【0049】

ハイブリダイゼーションは、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)）に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

#### 【0050】

本発明における特定のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列と全アミノ酸配列に亘ってアラインメントして比較した場合に、全体の平均で80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは99%以上のアミノ酸が同一であるようなアミノ酸配列を意味する。従って、或るアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るポリペプチドは、該アミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同等の機能を有するものと考えられる。

## 【0051】

又、本発明ポリペプチドにおける特定のアミノ酸配列において一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同等の機能を有する限りにおいて、好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列から成るものと意味する。又、ポリペプチドの「機能」とは、それが細胞（菌体）の内部及び／又は外部において示す生物学的機能又は活性を意味する。

## 【0052】

上記の特定のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るポリペプチド、又はその一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列から成るポリペプチドは、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、及びPCR法等の当業者に周知の方法を適宜組み合わせて、容易に作成することが可能である。

## 【0053】

尚、その際に、実質的に同等の機能を有するためには、当該ポリペプチドを構成するアミノ酸のうち、同族アミノ酸（極性・非極性アミノ酸、疎水性・親水性アミノ酸、陽性・陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸など）同士の置換が可能性として考えられる。又、実質的に同等の機能の維持のためには、本発明の各ポリペプチドに含まれる機能ドメイン内のアミノ酸は保持されることが望ましい。

## 【0054】

本発明の各方法で有利に使用することができる微生物の好適例として既に記載した各種形質転換菌は、当該技術分野における周知の様々な技術及び手段を用いて、夫々のDNA又は遺伝子を含む組換えベクターを作成し、該組換えベクターで上記の糸状性細菌、真核糸状真菌、及びそれらの変異株等の宿主を、例えば、プロトプラスト-PEG法、エレクトロポレーション法、Ti-プラスミド法、及びパーティクルガン等のような当業者に公知の組換え法によって得ることが出来る。

## 【0055】

既に記載したように、これら形質転換菌においては各物質の生産誘導の抑制が解除されていることが望ましい。その為には、例えば、これらの物質をコードする遺伝子を構成的発現プロモーター又は各種の誘導型発現プロモーター等の制御下で発現させることができる。その結果、これら物質を高発現され、細胞表面又は菌体外に多量に生産されプラスチック分解が促進され、更に、有用物質の生産が促進される。

#### 【0056】

これらの各種プロモーターは当業者に公知である。例えば、アスペルギルス・オリゼ用の構成的発現プロモーターとしては、enoA プロモーター、pgkA プロモーター、及びtef1プロモーター等を挙げることが出来る。又、アスペルギルス・オリゼ用の誘導型発現プロモーターとしては、マルトースを誘導基質とするグルコアミラーゼプロモーター又は $\alpha$ -アミラーゼプロモーター、及びキシロースを誘導基質とするキシラナーゼプロモーター等を挙げることが出来る。

#### 【0057】

##### 【実施例】

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、上記のCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) に記載されている方法に従った。

#### 【0058】

##### 【実施例1】

(1) 菌体プラスチック吸着因子 - ハイドロホービン遺伝子の取得

(1-1) A. oryzae による生分解性プラスチック転換確認

[材料]

##### ①試薬

特にことわりの無い限り、ナカライテスク (株) の特級試薬を用いた。生分解性プラスチックとしてポリブチレンサクシネート (PBS) を選択し、PBSエマルジョンは昭和高分子 (株) 製のビオノーレエマルジョン OLX-07527 を用いた。試薬の調製はミリQ水を用いた。

②菌体

麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 を用いた。

③培地

以下の表 1 に示した。

【 0 0 5 9 】

【表 1】

10 × stock solution (pH 6.5) (/litter)		PBS emulsion minimal medium (1/litter)	
		upper medium	
NaNO <sub>3</sub>	60 g	10 × stock solution	100ml
KCl	5.2 g	1000 × trace elements solution	1ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.2 g	PBS emulsion liquid	10ml
adjust to pH 6.5 with 10 N KOH		1M MgSO <sub>4</sub>	2ml
		agarose	5g
1000 × trace elements solution (/litter)		lower medium (1/litter)	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g	10 × stock solution	100ml
Zn · 7H <sub>2</sub> O	8.8 g	1000 × trace elements solution	1ml
Cu · 5H <sub>2</sub> O	0.4 g	1M MgSO <sub>4</sub>	2ml
Mn · 4H <sub>2</sub> O	0.15 g	agarose	15g
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	0.1 g	pour the medium on the lower medium	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05 g		

【 0 0 6 0 】

[方法]

炭素源をPBS に限定した最少寒天培地 (PBS emulsion minimal medium) に各種のアスペルギルス属糸状菌 (*A. oryzae*, *A. sojae*, *A. kawachii*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. nidulans*) の孢子懸濁液を スポットし37℃で7日間培養した。同

様にPBSを唯一の炭素源とした最少液体培地5mlに*A. oryzae*孢子懸濁液を終濃度 $0.5 \times 10^5$  個/mlとなるよう植菌し、30℃で5日間振盪培養した。なお、液体培養は試験管で行なった。

#### 【0061】

##### [結果]

固体培養では*A. oryzae*, 及び *A. sojae*の場合に、夫々、約1.9 cm及び約1.5 cm幅のhaloが観察された(図1(A))。又、*A. nidulans*でもhaloが観察された。又、*A. oryzae*の液体培養でもPBSの濁度の顕著な低下が観察された(図1(B))。これらのことから、*A. oryzae* 等のアスペルギルス属糸状菌がPBS転換能力を持つことを確認された。

#### 【0062】

更に、生分解性プラスチックとしてPBSの代わりにポリ乳酸(PLA)を使用した各培養系において、*A. oryzae* によるプラスチックの分解を確認した。その結果を図2に示す。

#### 【0063】

(1-2) DNAマイクロアレイを用いた発現遺伝子解析

(1-2-1) 麹菌Total RNA の調製

##### [材料]

菌体からのTotal RNAの調製には、Sepasol-RNA I Super (ナカライテスク(株))を用いた。

##### ②培地

培地の組成、DNAマイクロアレイ解析を行なう上での培養条件とその組み合わせを表2及び図3に示した。

#### 【0064】

【表 2】

C source	Succinate	1,4-butanediol	PBS emulsion	PBS pellets
the quantity of C sources	10g	10ml	4.3ml	100g
the volume of cultures	150ml	150ml	450ml	1500ml
cultivating times	24h	24h	60h	120h

【 0 0 6 5 】

〔方法〕

500 ml 容羽根付き三角フラスコ内のCzapek-Dox 培地150 ml に 終濃度が  $0.5 \times 10^7$  個/ml になるよう胞子懸濁液を植菌し、30℃で12時間培養した。菌体をミラクロス (CALBIOCHEM) で集菌し、滅菌水で洗浄後余分な水分を取り除いた。この回収した菌を、PBS固型ペレット、PBSエマルジョン、コハク酸、1,4-ブタンジオール を各々唯一の炭素源とした最少培地へと移し、30℃で振盪培養を行なった。培養時間はPBS pellets は120 時間、PBSエマルジョンは70 時間、コハク酸は12 時間、1,4-ブタンジオールは24 時間とした。培養終了後、PBS エマルジョン、コハク酸、1,4-ブタンジオール培地は、ミラクロスを用いて菌体を回収し、滅菌水で洗浄後余分な水分を取り除いた。PBS固型ペレットは、茶漉しを用いて菌体とPBS固型ペレットを分離した。得られた湿菌体の湿重量を計測した後、乳鉢中で液体窒素を注ぎながらパウダー状になるまで破碎した。湿重量の4倍量のSepasol-RNA I Super を入れた50 ml容チューブにパウダー状の菌体を移し、激しく攪拌後室温で5分間放置した。Sepasol-RNA I Superの1/5量のクロロホルムを加え、よく攪拌した後、室温で3分放置した。10,000×g、4℃で15分遠心した後、水層を15 ml容チューブに移し同量の水飽和酸性フェノール・クロロホルム (フェノール/クロロホルム = 1 / 1) を加え混合後、12,000×g、4℃で10分遠心し水層を別の15 ml容チューブに移した。等量のイソプロパノールを加え室温で放置10分間放置後12,000×g、4℃で10分遠心し、上清を捨て、10 mlの70% エタノールでリンスした。風乾後、適量のDEPC (diethylpirocarbonate) 処理水

に溶解させた。

# 【0066】

(1-2-2) mRNA の精製

[材料]

mRNAの精製には、Message Maker (Gibco BRL) を用いた。

[方法]

精製操作はMessage Maker 添付マニュアルに従った。以下、Total RNA量 1 mg を用いた時の手順を示した。

# 【0067】

1 mg のtotal RNAを15 ml容チューブに1.8 mlにDEPC処理水を用いてフィルアップ (終濃度0.55 mg/ml) し、65℃で5分間インキュベート後、氷上にて急冷した。5 M NaCl を200  $\mu$ l加え、よく攪拌後oligo (dT) Cellulose Suspension を1 ml添加し、よく混合した後、37℃で10分間インキュベートした。サンプルをシリンジに入れプランジャーで押し切った後、ディスクのカップに入れた3 mlのWash buffer 1 をシリンジで吸った。シリンジ中の液をよく懸濁し、液をプランジャーで押し切った。同様の操作を3 mlのWash buffer 2 で行なった。次に65℃に保温しておいたDEPC処理水1 mlをシリンジで吸い上げ、よく懸濁後、15 mlチューブに押し出した。再度、DEPC処理水1 mlで溶出した後、溶出液を合わせ、1,2000×g、4℃で3分間遠心し、oligo (dT) Cellulose Suspensionを取り除いた。この上清約2 mlに対し、5 mg/ml のグリコーゲン溶液を20  $\mu$ l、7.5 M 酢酸アンモニウム (pH 5.2) を200  $\mu$ l加えて混合し、エッペンドルチューブ5本に分注し、2倍量の氷冷エタノールを加え、-20℃にて一晚エタノール沈殿を行なった。12,000×g、4℃で30分間遠心した後、上清を捨て75%エタノールでリンスした、風乾後、適量のDEPC処理水に溶解させた。

# 【0068】

(1-2-3) mRNAのラベリング

[材料]

精製したmRNAの蛍光色素によるラベリングはCy3-dUTP、Cy5-dUTP (Amersham Biosciences) を用いた。



## [方法]

エッペンドルフチューブに、mRNA 0.5~1.0 $\mu$ g、ランダムプライマー (9 mer) (2 $\mu$ g/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、oligo(dT)primer (12-18mer) (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l、DEPC処理水を加え10 $\mu$ lとした。70℃で10分インキュベートした後、室温に10分放置し、その後氷上で5分間以上放置し、mRNAにプライマーをアニーリングさせた。次に、この反応液に5×First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3、375 mM KCL、15 mM MgCl<sub>2</sub>) 4 $\mu$ l、0.1 M DTT 2 $\mu$ l、50×dNTPs (25 mM dATP, GTP, CTP、10 mM TTP) 0.4 $\mu$ l、Cy-dye (3 or 5) 2 $\mu$ l、Super Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1.5 $\mu$ l を加えピペッティングによる攪拌後42℃で1時間インキュベートし逆転写反応させた。なお、この操作以降直接光が当たらないように注意して行なった。その後再びSuper Script II RT (200 U/ $\mu$ l) 1.5 $\mu$ l を加え攪拌し、42℃、1時間、70℃、10分、37℃、5分インキュベートした後、RNase H (10 U/ $\mu$ l) 0.3 $\mu$ l 加え、37℃、15分、70℃、10分インキュベートし未反応mRNAを分解させた。専用のチューブに装着したMicrocon-30 のカップに各々の組み合わせ (図3) でCy3、Cy5でラベルした溶液を混合し、300 $\mu$ lのTE を加え、10,000 g 室温で20分間遠心濃縮した。再度400 $\mu$ lのTE を加え10,000 g 室温で20分間遠心濃縮した。次にHuman Cot1-DNA (1 mg/ml) 60 $\mu$ lとTE 300 $\mu$ l を加え、10,000 g 室温で30分間遠心濃縮した。Microcon-30 のカップを取り出し、新しいチューブに逆さに挿入し、3,000 g 室温で3分間遠心してカップ中の溶液を回収した。これをTEで28 $\mu$ l にフィルアップした後、yeast tRNA (10 mg/ml) 4 $\mu$ l、poly dA (1 mg / ml) 16 $\mu$ l、20×SSC 10.2 $\mu$ l、10% SDS 1.8 $\mu$ l を加えた。この混合液60 $\mu$ l を1分間煮沸し、室温に戻したものをを用いてハイブリダイゼーションを行なった。

## 【0069】

(1-2-4) ハイブリダイゼーション、洗浄、検出

## [材料]

A. *oryzae* の2146個のESTクローンを搭載したcDNA マイクロアレイ (旭テクノグラス (株) 製) を用いた。ギャップカバーガラス (25×50 mm) はMATSUNAMI (株) 製を用いた。ハイブリダイゼーションカセットはArray.IT を用いた。また、スキャナー解析はAxon 社製 Gene Pix 4000B microarray scanner にて、画

像解析はAxon 社製 Gene Pix Pro 3.0 software package および Mesia Cybernetics 社製 Array Pro program を用いた。

#### 【0070】

##### [方法]

スライドガラスの上に遺伝子がスポットされた領域を囲むように、ギャップカバーガラスをのせ、端から上記で調製したラベル化溶液 $30\mu\text{l}$ を毛細現象により流し込んだ。スライドガラスをハイブリダイゼーションカセットにセットし乾燥を防ぐためにカセット内の窪みに $30\mu\text{l}$ の精製水とガラス上のカバーガラスと離れた2点に $5\mu\text{l}$ の $3\times\text{SSC}$ を滴下した。ハイブリダイゼーションは $55^{\circ}\text{C}$  8時間ゆるやかに振盪させながら行なった。ハイブリダイゼーション終了後、以下の操作でスライドガラスの洗浄を行なった。ハイブリダイゼーションカセットを外し、スライドガラスを $2\times\text{SSC} / 0.1\%\text{SDS}$ に浸して液中ですばやく滑り落とした。別に準備した $2\times\text{SSC} / 0.1\%\text{SDS}$ 中で5分間室温にて振盪した。続いて、 $40^{\circ}\text{C}$ に保温してある $0.2\times\text{SSC} / 0.1\%\text{SDS}$ 中で5分間振盪した後、 $0.2\times\text{SSC}$ 中に3分間放置した。 $300\times g$ で1分間遠心し、スライドガラスの水分を除いた後、検出を行なった。コントロール（コハク酸）の発現量がサンプル（PBS 固形ペレット、PBS エマルジョン、1,4-ブタンジオール）のそれよりも多い場合、DNAチップのスポットは緑色に発色する。発現量が同程度の場合は黄色に発色し、サンプルの発現量がコントロールより上回る場合は、赤色に発色する。よって、PBS存在時に特異的に発現している遺伝子はSu3PP5 とSu3PE5 で赤色に発色し、Su3Bu5 では発色がないものである（図4）。よって、Su3PP5 とSu3PE5 で赤色に発色している遺伝子群から、Su3Bu5で赤色に発色している遺伝子群を差し引き、PBS存在時に特異的に発現している遺伝子を検索した。なお、Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5全てに共通して発現するヒストンをコードする遺伝子を黄色、つまり、シグナル強度（Cy5 / Cy3）約1に設定した。

#### 【0071】

##### [結果]

Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5のDNAマイクロアレイの結果を視覚的に解析すると、JZ3981が、Su3PP5 とSu3PE5でのみ赤色に発色していた（図5）。尚、スポット

の下に示された各数字は、遺伝子発現を (Cy 5 / Cy 3) の比で表わしている。ヒストンはコントロールである。このことから、JZ3981がPBS分解に関わる遺伝子であることが示された。次にこのクローンについて、Aspergillus oryzae ESTデータベース ([www.aist.go.jp/ffdb/index.html](http://www.aist.go.jp/ffdb/index.html)) に対するBLASTネットワークサービスを用いて、相同性の高いクローン情報を得た。

### 【0072】

(1-2-5) ESTデータベースを用いたJZ3981の探索

#### [結果]

A. oryzae ESTデータベースに対してBLASTネットワークサービスを用いて、相同性の高いクローン情報を検索した。JZ3981 はEmericella nidulans のRODLET PROTEIN PRECURSOR に4e-57、Aspergillus fumigatus のHYDROPHOBIN PRECURSOR に 9e-57 の相同性を示した。さらに、hydrophobin (ハイドロホービン) に保存されている8つのシステイン残基を含んでおり、このクローンはA. oryzae のhydrophobin (ハイドロホービン) 遺伝子(hyp)であることが明らかとなった。

### 【0073】

(1-3) 麹菌A. oryzaeハイドロホービン遺伝子(hyp)の単離

(1-3-1) JZ3981の塩基配列の解析

ESTクローンJZ3981のEST情報は部分配列のみであったので、JZ3981の全塩基配列を決定した。

#### [方法]

ABI PRISM 310 Genetic Analyzerを用いてシーケンシングを行なった。

JZ3981	4 $\mu$ l
M 13 Universal primer (F or R )	4 $\mu$ l
<u>Terminator Ready Reaction mix</u>	<u>8 <math>\mu</math> l</u>
DDW	up to 20 $\mu$ l

### 【0074】

上記のような反応系を作製し、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造(株)) にてPCR反応を行なった。PCR反応条件は 96℃ 3分、96℃ 10分、50℃

5分、60℃4分を30cycleとした。PCR反応後、エタノール沈殿を行なった後、loading dye 15 $\mu$ lに溶解し3分間煮沸したのち、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerに供し、ABI PRISM Sequencing Analysis version 3.0 で解析した。

【結果】 JZ3981がハイドロホービンの完全長を含むことを確認した（図6）。

#### 【0075】

##### 【実施例2】

##### (2) ハイドロホービン高発現麹菌の育種

##### (2-1) 麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドの構築

ハイドロホービン 高発現麹菌を育種するために、麹菌用ハイドロホービン高発現プラスミドを構築した。麹菌発現用ベクターであるpNGA142 系ベクターを用いた（「キノコとカビの基礎科学とバイオ技術」 宍戸和夫・編著（アイピーシー） p. 534）。また、ハイドロホービンの高発現には構成的プロモーターの存在が不可欠であるため、目的遺伝子上流に目的遺伝子（hyp）の上流にenoA promoter を融合させたpNG-enoP-hypを作製した（図7）。

#### 【0076】

##### 【材料】

##### ①試薬

各種制限酵素、修飾酵素類は宝酒造（株）、Boehringer Mannheim 山之内（株）、New England Biolabs のものを適宜用いた。試薬を調製する際はミリQ水を用い、特に断りのない限り121℃、20分間オートクレーブ滅菌した。

##### ②菌株

大腸菌（*Escherichia coli*）はXL1-Blue(Stratagene社製）を用いた。麹菌は*A. oryzae* RIB40を用いた。

##### ③培地

用いた大腸菌用培地は、Stratagene社のXL1-Blue添付のマニュアルに従った。

##### 1-4-1) pNG-enoP-hyp の構築

##### 「材料」

##### ④ベクター

ベクターとしては、enoA promoter を含むpNGEG-d1 (Toda T. et al., Curr.

Genet. 40:260-267, [2001])を使用した。インサートを含むJZ3981 (pSPORT 1-hyp) は醸造研究所 (現在の独立行政法人酒類総合研究所: 広島県広島市鏡山 3-7-1) から分譲を受けた。

【0077】

#### 「方法」

##### ①制限酵素によるDNAの切断

pNGEG-d1、pSPORT 1-hyp各々をXba I とSal I により切断した。

##### ②ベクターDNA、インサートDNAの調製

ベクターDNA、インサートDNAともに、制限酵素で完全に切断した後、アガロースゲル電気泳動に供し、長波長 (366nm) UV下でDNAフラグメントを切り出した。その後、prep A gene (Bio-Rad-Laboratories) にてDNAを回収し、ベクターDNA、インサートDNAとした。

##### ③ライゲーション

ライゲーション反応は調整したベクターDNAとインサートDNA、さらにT4 DNA ligase (GIBCO BRL Lifetechnology)、5×ligation buffer (250 mM Tris-HCl; pH7.6、50mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ATP、5 mM DTT、25%PEG-8000)、滅菌水で20 $\mu$ lにし16℃で16時間反応させた。

##### ④大腸菌の形質転換

ライゲーション液10  $\mu$ l に10  $\mu$ lの10×KCM (1 M KCl、0.3 M CaCl<sub>2</sub>、0.5 M MgCl<sub>2</sub>)、7  $\mu$ l の30%ポリエチレングリコール (#6000)、73 $\mu$ l の滅菌水を加え、よく攪拌した。これを氷中でよく冷却した後、氷上解凍したコンピテントセルを100 $\mu$ l 加え穏やかに攪拌し、氷中で20分間、続いて室温で10分間放置した。これに、200  $\mu$ l の LB液体培地を加え、100  $\mu$ g / ml のアンピシリンを添加したLB平板培地にまき、37℃で一晩培養した。

##### ⑤プラスミドDNAの調製

目的のプラスミドDNAを用いて形質転換した大腸菌の単一のコロニーを3 ml の100  $\mu$ g / ml のアンピシリンを添加したLB液体培地に植菌し、37℃で一晩振盪培養した。1.5 ml の培養液を2 mlのエッペンドルフチューブに移して15,000×gで1分間遠心分離し、沈殿を100 $\mu$ l の氷冷したTEG (25 mM Tris-HCl、10 mM EDT

A、50 mM Glucose、pH 8.0) で懸濁し、これに200  $\mu$ l の0.2 N NaOH-1% SDSを加えて穏やかに攪拌した後、150  $\mu$ l の3 M NaOAc pH 5.2 を加えて混合した。これを 15,000 $\times$ gで4  $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離し上清を回収し450  $\mu$ l のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて激しく攪拌した後、15,000 $\times$ g、室温で5分間遠心分離し上層を回収した。この溶液に-20  $^{\circ}$ Cで氷冷した900  $\mu$ lのエタノールを加えて-20  $^{\circ}$ Cで10分間放置後、15,000 $\times$ gで4  $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離した。沈殿を500  $\mu$ lの70 %エタノールでリンスしたのち、乾燥させ、最後にRNase (100  $\mu$ g / ml) を含むTE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 50  $\mu$ lに溶解した。得られたプラスミドをXba I とSal I で切断後、アガロース電気泳動により挿入断片の存在を認め、pNG-enoP-hypの完成を確認した。

#### 【0078】

##### (2-2) ハイドロホービン高発現麹菌の形質転換・育種

アスペルギルス・オリゼの形質転換はプロトプラスト-PEG法を改良した方法を用い、形質転換するプラスミドDNAは上記で作製したpNG-enoP-hyp, pNG-enoP (pNG-enoP-hypのハイドロホービン遺伝子インサート無し-ベクターのみ) を用いた。これらのプラスミドDNA10  $\mu$ gをMun I で完全消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理を行った後 10  $\mu$ lのTEに溶解し形質転換用DNA溶液とした。

アスペルギルス・オリゼ niaD300 株 (RIB40株由来の硝酸還元酵素遺伝子 (niaD) 欠損変異株: 醸造研究所より分与) の孢子懸濁液をYPD液体培地に添加し、30 $^{\circ}$ C、12時間振盪培養した。培養液よりガラスフィルターを用いで集菌した。菌体を50ml容の遠心チューブに移し、10mlのプロトプラスト化溶液(0.6M KCl, 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.5, 5mg/ml Lysing enzyme(Sigma Chemical Co.), 10mg/ml Cellujase Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Ind.Co.,Ltd.), 10mg/ml Yatalase (TaKaRa) )を加え懸濁し、30 $^{\circ}$ C90rpm, 3 時間振盪しプロトプラスト化反応を行った。滅菌したMIRACLOTH(CALBIOCHEM) にて濾過し、濾液中のプロトプラストを 3000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分間遠心分離することで沈殿として得た。1.2M ソルビトール, 50mM CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl buffer, pH7.5にて3 回プロトプラスト

を洗浄し、3000×g, 4℃, 5 分間遠心分離することで沈澱として得た。このプロトプラストを $1 \times 10^9$ 個プロトプラスト/mlになるように1.2M ソルビトール, 50mM CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl buffer, pH7.5 で懸濁した。プロトプラスト懸濁液100  $\mu$ lに前述の形質転換用プラスミドDNA溶液 各10  $\mu$ lと12.5  $\mu$ lのSol I (50(w/v%) PEG #4000, 50mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl buffer, pH7.5を加えよく混合し、氷中で30 分間放置した。次にこの混合液を50ml容の遠心チューブに移し、1mlのSol Iを加え混合した後、2mlの1.2M ソルビトール, 50mM CaCl<sub>2</sub>, Tris-HCl buffer, pH7.5を加えよく混合した。55℃に温めておいた Czapek-Dox 寒天培地にプロトプラスト懸濁液を加え混合し、Czapek-Dox寒天培地に重層した。その後、30℃ で孢子を形成するまで培養した。

# 【 0 0 7 9 】

孢子形成後、白金針にて分生子柄をかきとり、0.01% (v/v%) Tween80に懸濁し、この懸濁液を希釈し、Czapek-Dox寒天培地に広げ 30℃ で培養することを繰り返し単孢子分離をおこなった。単孢子分離の確認は Hondel 法(孢子PCR法)を改変しておこなった。白金針にて 200  $\mu$ l の YPD 培地が入った 1.5ml 容マイクロチューブに分生子を添加し、30℃ で 40 時間培養した。培養菌体を新しい 1.5ml 容マイクロチューブに移し、50  $\mu$ l のプロトプラスト化溶液 0.8M KCl, 10 mM クエン酸, pH6.5, 2.5mg/ml Lysing enzyme (Sigma Chemical Co.), 2.5mg/ml Yatalase (TaKaRa) )を加えて懸濁し、37℃で一時間放置し、5分間以上氷上に放置し菌体を沈澱させた。この上清 5  $\mu$ l を鋳型としてPCR の反応系に用いた。pNG-enoP-hypの孢子PCR用のプライマーとして5' -ATTCCGCGAAAATGGTAGCTCGAGGA-3' と 5' -GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' の 2 種のオリゴヌクレオチドを合成し、pNG-enoPのプライマーとして5' - GTAGAATCACGAATGAGACCTTTGACGACC-3' と5' - GTTAGTCGACTGACCAATTCCGCAG-3' の2種のオリゴヌクレオチドを合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造)を用いた。ポジティブコントロールとして形質転換に使用にしたプラスミド DNA を鋳型とした。pNG-enoP-hypの増幅反応は 95℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間, 55.5℃, 1 分間, 72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ4℃ で保持した。pNG-enoPの増

幅反応は95℃, 3分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1分間, 57℃, 1分間, 72℃, 90秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95秒間で完全伸長させ4℃で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロース電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より、麴菌の染色体 DNA 上にエノラーゼプロモーター配列下流にハイドロホービン遺伝子の挿入された配列の存在が確認され、pNG-enoPもまた形質転換されたことが確認された。

#### 【0080】

形質転換された ハイドロホービン 高発現麴菌とハイドロホービン遺伝子を挿入していない麴菌 (pNG-enoP) を 200ml のYPD 培地 (1(w/v%)酵母エキス, 2(w/v%)ペプトン, 2(w/v%)グルコース) に2500孢子/ml濃度で植菌し、30℃, 24時間振盪培養しガラスフィルターで菌体を濾過し、培養上清を得た。培養上清 1ml に対して 500 $\mu$ l の 100 (w/v%) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後、氷中に 12-16 時間放置した。サンプルを 15000 $\times$ g, 4℃, 20 分間遠心分離し上清を完全に除いた後、沈澱を 15 $\mu$ l の SDS 化溶液 (0.063M Tris-HCl buffer, pH6.8, 2 (w/v%) SDS, 1(v/v%) 2-メルカプトエタノール, 10(w/v%) グリセロール, 0.05(w/v%) ブロモフェノールブルー) に溶解させたあと、沸騰湯浴中に5分間放置し SDS化をおこない、これをサンプルとした。以後の SDS-PAGE と PVDF膜へのプロッティングの方法は Schagger ら (Schagger, H., et al. (1987) Anal. Biochem., 166, 368-379) の方法にしたがった。泳動板は、160mm $\times$ 160mm, 1mm 厚のものを使用し、電流 10mA 一定で泳動を開始しサンプルのグリセロール前線が泳動板の先端まで泳動したところで電気泳動を止めた。その後、電気泳動したゲルをPVDF膜に転写し、PVDF膜上より 14.3kDa の断片を切り抜き、そのままアミノ末端アミノ酸配列の解析をおこなった。解析の結果アミノ末端からLPPAS であり、麴菌ハイドロホービン EST クロンの塩基配列をアミノ酸置換したものと相同検索をしたところ一致したため培養上清に ハイドロホービンがあることが確認された。また PVDF 膜に転写すると同時に CBB 染色をしたところハイドロホービン遺伝子を挿入していない麴菌の培養上清からは、分子量14.3kDaにバンドが確認されなかったことから。ハイドロホービン高



発現麹菌はその細胞表層のみならず高度にハイドロホービンを培養上清に分泌していることが確認された(図8)。

#### 【0081】

尚、プラスミドDNA (pNG-enoP-hyp) で形質転換された ハイドロホービン高発現麹菌は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1) に平成14年10月4日付けで寄託され、受託番号: FERM P-19055を付与されている。

#### 【0082】

##### 【実施例3】

(3) 生分解性プラスチック分解酵素クチナーゼ遺伝子の取得とその高発現麹菌の育種

生分解性プラスチック分解因子として分解酵素があげられる。そこで、生分解性プラスチック分解酵素遺伝子を取得するとともに、その高発現麹菌株の育種を行った。生分解性プラスチックとしてはPBSを用いた。

#### 【0083】

(3-1) アスペルギルス・オリゼ由来 PBS (ポリブチレンサクシネート) 分解酵素の精製

$0.5 \times 10^6$  個胞子/ml となるようにアスペルギルス・オリゼ RIB40 胞子懸濁液を 500 ml 容三角フラスコ内の 100 ml の 1 (v/v %) PBS 乳化液(昭和高分子)を含み、唯一の炭素源とした Czapek Dox 培地 ( $34 \mu\text{g/ml}$  クロラムフェニコール)(Nakajima, K., et al. (2000) Curr. Genet., 37, 322-327) に添加した。添加後  $30^\circ\text{C}$ , 125 rpm, 5 日間培養した。培養液を MIRACLOTH (CALBIOCHEM (登録商標)) にて濾過し、その濾液を 8000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 20 分間遠心分離し得られた上清を粗酵素液とした。粗酵素液に 20% 飽和となるように硫酸アンモニウムを加えた後、8000 g,  $4^\circ\text{C}$ , 20 分間遠心分離し得られた上清画分を得た。上清画分を 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 20 % 飽和硫酸アンモニウムにて平衡化した Octyl-Cellulofine (生化学工業) に供し、吸着画分を 20-0 % 飽和硫酸アンモニウムの直線濃度勾配による溶出させた。分画した溶液に対して 0.1 (v/v %) となるように PBS 乳化液を添加し、 $37^\circ\text{C}$  にて保温し、その濁度の低下 (P

BS の分解) によって活性画分を追跡した。得られた活性画分を 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 に対して透析し、同緩衝液にて平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650S カラム (東ソー) に供し、吸着画分を 0-0.3 M NaCl の直線濃度勾配により溶出させた。得られた活性画分を 10mM MES 緩衝液, pH 5.5 に対して透析し、同緩衝液にて平衡化した HiTrap SP カラム (アマシャムファルマシア バイオテック) に供し、吸着画分を 0-0.3 M NaCl の直線濃度勾配により溶出させた。得られた活性画分を SDS-PAGE (Laemmli, U. K. (1970) Nature, 227, 680-685) に供し電気泳動的に均一であることが確認されたため、ここで得られた活性画分を PBS 分解酵素精製標品とした。

#### 【0084】

##### (3-2) PBS 分解酵素の内部アミノ酸配列の決定

上記で得られた精製酵素溶液 (0.4 mg/ml) 250  $\mu$ l に対して 200  $\mu$ l の 100 (w/v %) 冷トリクロロ酢酸を加え、よく混合した後、氷中に 12-16 時間放置した。サンプルを 15000 g, 4°C, 20 分間遠心分離し、上清を完全に除いた後、沈殿を 50  $\mu$ l の SDS 化溶液 {0.063 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 2 (w/v %) SDS, 1 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 10 (w/v %) グリセロール} に溶解させた後、沸騰湯浴中に 5 分間放置し SDS 化をおこない、これをサンプル溶液とした。別に V8 プロテアーゼ溶液 {6.3  $\mu$ g の V8 プロテアーゼを 25  $\mu$ l の 0.05 (w/v %) プロモフェノールブルー, 0.019 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 0.6 (w/v %) SDS, 0.3 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 3 (w/v %) グリセロールに溶解させたもの} を調製した。以後の SDS-PAGE と PVDF 膜へのプロッティングの方法は Schagger らの方法 (Schagger, H., et al. (1987) Anal. Biochem., 166, 368-379) に従った。160 mm x 160 mm, 1 mm 厚の泳動板を使用した。50  $\mu$ l のサンプル溶液をウェルにアプライし、さらに 25  $\mu$ l の V8 プロテアーゼ溶液を重層した。電流 15 mA 一定で泳動を開始し、色素 (プロモフェノールブルー) が濃縮ゲルのほぼ中間まで泳動された時点で泳動を停止し、そのまま室温にて 1 時間放置し、ゲル内での V8 プロテアーゼによる限定分解をおこなった。その後電気泳動を再開し、泳動後ゲル内のタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜上より 7.9 kDa、10.3 kDa、11.9 kDa の断片を切り抜き、そのまま

アミノ末端アミノ酸配列の解析をおこなった (Matsudaira, P. (1987) J. Biol. Chem., 262, 10035-10038)。10.3 kDa、11.9 kDa のアミノ末端アミノ酸配列を解析した結果、両者共にアミノ末端側より、AQGLFEQAVS、であった。得られたアミノ酸配列に対して National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のBLAST 検索 (Zhang, J., et al. (1997) Genome Res., 7, 649-656) を利用して相同検索をおこなったところ、アスペルギルス・オリゼの産生するクチナーゼの内部アミノ酸配列と一致した (Ohnishi, K., et al. (1995) FEMS Microbiol. Lett., 126 (2), 145-150)。

### 【0085】

#### (3-3) PBS 分解酵素遺伝子を含む染色体 DNA のクローニング

PBS 分解酵素遺伝子を含む染色体 DNA を取得するために、アスペルギルス・オリゼの菌糸より染色体 DNA を調製した。0.5 x 10<sup>6</sup> 個胞子/ml となるようにアスペルギルス・オリゼ RIB40 胞子懸濁液を 500 ml 容三角フラスコ内の 100 ml の YPD 液体培地 {1 (w/v %) 酵母エキス, 2 (w/v %) ペプトン, 2 (w/v %) グルコース} に添加した。添加後 30℃, 125 rpm, 16 時間培養した。培養液をガラスフィルターで濾過し菌糸を集め、蒸留水で洗浄した。菌糸を脱水した後、予め -20℃ に冷やしておいた乳鉢に菌体を入れ、液体窒素を注いで凍結させ、直ちに冷やした乳鉢で細かく粉碎した。粉碎した菌糸をスパーテルで 1.5 ml 容マイクロチューブにとり、0.4 ml の TE (10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 1 mM EDTA) に懸濁した後、溶菌溶液 {2 (w/v %) SDS, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.0} を 0.4 ml 加えてゆっくり攪拌し、室温に 15 分間放置した。15000 g, 10 分間遠心分離して上清を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を等量加え、ゆっくりチューブを上下に攪拌した後、15000 g, 5 分間遠心分離して上清を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。-20℃ に冷やしたエタノールを 2.5 倍量加えて、-20℃ に 10 分間放置した後、15000 g, 4℃, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を 0.5 ml の TE に溶解させ、5 µl の RNase A (10 mg/ml) 溶液を加え、37℃ に 30 分間放置し RNA を分解した。0.5 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール

(25:24:1) を加え、ゆっくりチューブを上下に撹拌した後、15000 g, 5 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。この操作をもう 1 回繰り返した。0.5 ml のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え、ゆっくりチューブを上下に撹拌した後、15000 g, 5 分間遠心分離して上清を新しい1.5 ml 容マイクロチューブに回収した。50  $\mu$ l の 5 M NaCl と 1 ml の冷エタノールを加え、-20℃に 10 分間放置した後、15000 g, 4℃, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。70 (v/v %) エタノールで DNA を洗浄して 15000 g, 4℃, 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を 0.1 ml の TE で溶解し、これを染色体 DNA 溶液とした。

#### 【0086】

次に、前述の内部アミノ酸配列をもとに、30 塩基からなるオリゴヌクレオチド (5' -GCACAAGGACTGTTTGAACAAGCTGTTTCC-3') と、既知のクチナーゼ遺伝子塩基配列を基に、30 塩基からなるオリゴヌクレオチド (5' -CCAGGCAGACAAGATCTCC CACGGCGCAAT-3') を合成した。この 1 組のプライマーセットを用い、染色体 DNA を鋳型として PCR をおこないサザンハイブリダイゼーションのプロープを増幅した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。染色体 DNA は 100 ng 用い、ポリメラーゼは Ex taq polymerase(宝酒造) を用いた。増幅反応は、95℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、95℃, 1 分間、60℃, 1 分間、72℃, 30 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 1 分間で完全伸長させ、4℃で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、300 塩基対からなる断片の増幅が確認された。

#### 【0087】

次に、NEN RandomPrimer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-A P (Eizo Diagnostics, Inc.) を用いてサザンハイブリダイゼーションとコロニーハイブリダイゼーションをおこなった。また今後使用した SSC 液は 20 倍濃度 (20x SSC) (175.4 g NaCl と 88.2 g Sodium Citrate Dihydrate を水に溶解し、1 l に合わせた後、オートクレープ滅菌したもの) を適宜滅菌水で希釈し調製したものを用いた。染色体 DNA 10  $\mu$ g を 50 ユニットの EcoR V (宝酒造) で完全消化しアガロースゲル電気泳動に供した。トレイにアルカリトランスファ

一緩衝液 (0.4 N NaOH) を入れ、ガラス板をのせ、緩衝液に届くまでの長さに予め切った濾紙 (ADVANTEC TOYO) をのせて緩衝液で湿らせた。この上に泳動後のゲルをのせ、同じ大きさに切ったナイロンメンブラン (Hybond-N+; アマシャムファルマシア バイオテク) をゲル上に置き、さらにその上に滅菌水で湿らせた濾紙を 3 枚のせた。ペーパータオルを 5 cm の高さに積み重ね、重りをのせた。12 時間ブロッティングしたあと、メンブランを 4x SSC で洗浄し、ハイブリダイゼーションをおこなった。

#### 【0088】

次に、前述の PCR 反応液に対して 1/10 量の 5 M NaCl を加えさらに 2.5 倍量の冷エタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$  に 10 分間放置した後、15000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。70 (v/v %) エタノールで DNA を洗浄して 15000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるように TE に溶解した。この DNA 溶液  $20\text{ }\mu\text{l}$  と NEN Random Primer Fluorescein Labeling Kit with Antifluorescein-AP の Random Primers and Reaction Buffer Mix  $5\text{ }\mu\text{l}$ 、Fluorescein Nucleotide Mix  $5\text{ }\mu\text{l}$ 、Klenow Fragment  $1\text{ }\mu\text{l}$  を加え、ピペッティングにより混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、0.1 M EDTA, pH 8.0 を  $5\text{ }\mu\text{l}$  加え、20 ng/ml となるように hybridization buffer {2x SSC, 0.1 (w/v %) SDS, 5 (w/v %) Dextran Sulphate, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent} と混合したものをプローブ溶液とした。

#### 【0089】

次にブロッティング後のメンブランを 2x SSC でリンスし、ハイブリダイゼーションバッグに移し、 $0.1\text{ ml}/\text{cm}^2$  となるように hybridization buffer と終濃度  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように Carrier DNA を加え、 $60^{\circ}\text{C}$  で 1 時間保温した。続いて  $200\text{ }\mu\text{l}$  の hybridization buffer とプローブ溶液  $20\text{ }\mu\text{l}$ 、Carrier DNA ( $10\text{ mg}/\text{ml}$ )  $35\text{ }\mu\text{l}$  をマイクロチューブ中で混合し、 $100^{\circ}\text{C}$  で 5 分間煮沸した。氷中で急冷しそのまま 5 分間放置した。これを予め  $60^{\circ}\text{C}$  に温めておき、ハイブリダイゼーションバッグ中の溶液と交換し、 $60^{\circ}\text{C}$  で 16 時間保温した。メンブランをハイブリダイゼーションバッグより取り出し、 $1\text{ cm}^2$  のメンブランあたり 1 ml 以上の 2x SSC, 1 (w/v %) SDS で  $60^{\circ}\text{C}$ , 15 分間激しく振盪することによっ

て洗浄し、次に 0.2x SSC, 0.1 (w/v %) SDS で 60℃, 15 分間同様に洗浄した。以後の操作は室温でおこなった。1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl 中で激しく 5 分間振盪することで洗浄した。次にプラスチックバッグ内の 1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 0.1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent 中で 1 時間振盪した。次にプラスチックバッグ内の 1 cm<sup>2</sup> のメンブランあたり 0.1 ml 以上の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5 (v/v %) Blocking Reagent, 1/1000 (v/v) Antifluorescein-AP Conjugate との混合液中で 1 時間振盪した。その後メンブランを取り出し 0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 0.15 M NaCl 中で 5 分間ずつ 4 回激しく振盪することで洗浄した。0.1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 9.5, 0.1 M NaCl 中で 5 分間ずつ 2 回激しく振盪することで洗浄した。メンブランをプラスチックバッグに移し、これに ECF substrate Auto Phos (Eizo Diagnostics, Inc.) を 1 ml 加え、遮光下で 30 分間反応させた。メンブランをプラスチックバッグから取り出しさらに 4 時間遮光下で放置した後、蛍光分析機 (FLA-2000; FUJIFILM) にて解析した。その結果約 1300 塩基対からなる強くハイブリダイズするバンドが検出された。

#### 【0090】

次に、染色体 DNA 10 µg を 50 ユニットの EcoR V で完全消化しアガロースゲル電気泳動に供しエチジウムブロマイドで染色後、1300 塩基対付近のゲルを UV 照射下で切り出した。ゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。

#### 【0091】

次にプラスミド pBluescript II KS+ DNA (Stratagene) 2.5 µg を EcoR V (宝酒造) にて消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造) により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。

#### 【0092】

次に、ベクター DNA 1  $\mu\text{g}$  と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu\text{g}$  を T4 DNA ligase (宝酒造)により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結 DNA 溶液 10  $\mu\text{l}$  と 10  $\mu\text{l}$  の 10x KCM (1 M KCl, 0.3 M  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 M  $\text{MgCl}_2$ )、7  $\mu\text{l}$  の 30 (w/v %) PEG#6000、73  $\mu\text{l}$  の滅菌水を混合し、100  $\mu\text{l}$  の形質転換可能な大腸菌 DH5  $\alpha$  (宝酒造)を加え、氷中に 20 分間、室温に 10 分間放置し形質転換大腸菌懸濁液を得た。ナイロンメンブラン (Hybond-N+; アマシャムファルマシア バイオテク) を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む LB 寒天培地上に置き、その上に形質転換大腸菌懸濁液をまき、37°C で 16 時間培養した。メンブランを培地上より剥がし取りメンブランを 10 (w/v %) SDS に 3 分間、0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl に 10 分間浸し、溶液を除いた後、1 M トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 1.5 M NaCl に浸し、溶液を除いた後、2x SSC で洗浄した。メンブランを 0.4 N NaOH に 1 時間浸し 2x SSC で洗浄した。このメンブランを前述のサザンハイブリダイゼーションの時と同様の操作をおこない、プローブをハイブリダイズした。その結果ポジティブシグナルを得た。

#### 【0093】

次に、元の寒天培地上からポジティブシグナルとなるプラスミド DNA を有する大腸菌を白金針にて拾い、LB 液体培地 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリン) に移植し 37°C にて 16 時間振盪培養した。培養液 1.5 ml を 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、15000 g, 1 分間遠心分離し培地を除いた。菌体を 100  $\mu\text{l}$  の TEG (25 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM グルコース) で懸濁し、これに 200  $\mu\text{l}$  の 1 (w/v %) SDS, 0.2 N NaOH を加え穏やかに混合し氷中に 5 分間放置した。さらに 150  $\mu\text{l}$  の 3 M 酢酸ナトリウム, pH 5.2 を加え穏やかに混合し氷中に 5 分間放置した。これに 10 M 酢酸アンモニウムを 150  $\mu\text{l}$  加え穏やかに混合し、15000 g, 4°C, 10 分間遠心分離し上清を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移した。これに 600  $\mu\text{l}$  の 2-プロパノールを加え、よく混合した後 15000 g, 4°C, 10 分間遠心分離し上清を除いた。70 (v/v %) エタノールで DNA を洗浄して 15000 g, 4°C, 10 分間遠心分離し上清を完全に除き沈殿を得た。沈殿を 0.1 ml の TE で溶解し、これをプラスミド DNA 溶液とした。このプラスミド DNA 中の挿入 DNA 断片の塩基配列を ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 DNA s

sequencer Long Read (PE Biosystem) のプロトコールに従い、ABI PRISM™ 377 DNA sequencing system (PE Biosystem) にて解析した。その結果、プラスミド DNA に挿入された 1334 塩基対からなる染色体 DNA の EcoRV 消化断片には、プローブの塩基配列を含むオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームは 3 箇所のイントロン塩基配列を含み、さらに開始メチオニンをコードする塩基配列 ATG とストップコドンを含み、すなわち PBS 分解酵素遺伝子の全長を有していた(Ohnish K. et al. (1995) FEMS Microbiol Lett., 126(2), 145-150)。

#### 【0094】

#### (3-4) PBS 分解酵素高発現系の構築

前述の PBS 分解酵素遺伝子全長を有するプラスミド DNA 5  $\mu$ g を EcoRV (宝酒造)にて消化し、アガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色後 UV 照射下で 1334 塩基対からなる断片を切り出した。ゲル中より prep A gene (BioRad) を用いて DNA を抽出し、これを挿入 DNA 断片とした。次に塩基配列中にグルコアミラーゼのプロモーター配列 (PglA 142) を有するプラスミド pNGA142 DNA 5  $\mu$ g をプロモーター配列の直後にある制限酵素 PmaC I 認識配列の位置で PmaC I (宝酒造)で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後、アルカリフォスファターゼ (宝酒造)により 5' 末端のリン酸を除去した。この反応液を定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 TE に溶解したものをベクター DNA 溶液とした。次に、ベクター DNA 1  $\mu$ g と挿入 DNA 断片 1.5  $\mu$ g を T4 DNA ligase (宝酒造)により連結させ、連結 DNA 溶液を得た。この連結 DNA 溶液 10  $\mu$ l と 10  $\mu$ l の 10x KCM (1 M KCl, 0.3 M CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M MgCl<sub>2</sub>)、7  $\mu$ l の 30 (w/v %) PEG#6000、73  $\mu$ l の滅菌水を混合し、100  $\mu$ l の形質転換可能な大腸菌 DH5  $\alpha$  (宝酒造)を加え、氷中に 20 分間、室温に 10 分間放置し形質転換大腸菌懸濁液を得た。次に 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地上に形質転換大腸菌懸濁液をまき、37℃で 16 時間培養した。培地上のコロニーを白金針にて拾い、LB 液体培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリン) に移植し 37℃にて 16 時間振盪培養した。培養菌体中より前述と同様にプラスミド DNA を抽出し、この麹菌



形質転換用プラスミド DNA (pNG-cut) を得た。このプラスミド DNA 10  $\mu$ g を Mun I で消化し、定法によりフェノール抽出、エタノール沈殿処理をおこなった後 10  $\mu$ l の TE に溶解し形質転換用 DNA 溶液とした。アスペルギルス・オリゼの形質転換は Vollmer らのプロトプラスト-PEG 法 (Vollmer, S. J., et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4869-4873) を改良しておこなった。アスペルギルス・オリゼ niaD300 株の孢子懸濁液を YPD 液体培地に添加し、30℃にて 12 時間振盪培養した。培養液よりガラスフィルターを用いて濾過、集菌した。菌体を 50 ml 容の遠心チューブに移し、10 ml のプロトプラスト化溶液 {0.6 M KCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5.5, 5 mg/ml Lysing enzyme (Sigma Chemical Co.), 10 mg/ml Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.), 10 mg/ml Yatalase (TaKaRa)} を加えて懸濁し、30℃, 90 rpm, 3 時間振盪しプロトプラスト化反応をおこなった。滅菌した MIRACLOTH (CALBIOCHEM (登録名)) にて濾過し、濾液中のプロトプラストを 3000 g, 4℃, 5 分間遠心分離することで沈殿として得た。1.2 M ソルビトール, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5 にて 3 回プロトプラストを洗浄し、プロトプラストを 3000 g, 4℃, 5 分間遠心分離することで沈殿として得た。このプロトプラストを 1x10<sup>9</sup>個プロトプラスト/ml となるように 1.2 M ソルビトール, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5 に懸濁した。プロトプラスト懸濁液 100  $\mu$ l に前述の 10  $\mu$ l の形質転換用 DNA 溶液と 12.5  $\mu$ l の 50 (w/v %) PEG#4000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5 を加えよく混合し、氷中で 30 分間放置した。次にこの混合液を 50 ml 容の遠心チューブに移し、1 ml の 50 (w/v %) PEG#4000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5 を加えよく混合した後、2 ml の 1.2 M ソルビトール, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5 を加えよく混合した。55℃に温めておいた Czapek-Dox 軟寒天培地にプロトプラスト懸濁液を加え混合し、Czapek-Dox 寒天培地に重層した。その後 30℃ で孢子を形成するまで培養した。

#### 【 0 0 9 5 】

孢子形成後、白金針にて分生子柄をかきとり、0.01 (v/v %) Tween 80 に懸濁し、この懸濁液を適宜希釈し、Czapek-Dox 寒天培地に広げ 30℃ で培養するこ

とを繰り返すことで単孢子分離をおこなった。単孢子分離の確認は Hondel 法（孢子 PCR 法）(van, Zeiji, C. M., et al. (1997) J. Biotechnol., Jan 3; 59 (3), 221-224) を改変しておこなった。白金針にて 200  $\mu$ l の YPD 培地が入った 1.5 ml 容マイクロチューブに分生子を添加し、30℃ で 40 時間培養した。培養菌体を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、50  $\mu$ l のプロトプラスト化溶液 {0.8 M KCl, 10 mM クエン酸, pH 6.5, 2.5 mg/ml Lysing enzyme (Sigma Chemical Co.), 2.5 mg/ml Yatalase (TaKaRa)} を加えて懸濁し、37℃, 1 時間保温し、150  $\mu$ l の 10 mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA を加え、95℃, 3 分間保温し、氷上に放置し、菌体を沈殿させた。この上清 5  $\mu$ l を鋳型として PCR の反応系に用いた。孢子 PCR 用プライマーとして、2 種のオリゴヌクレオチド (5' -TGCAGTGGCGGATCCGGTGGAC-3' , 5' -GTAGAATCACGAATGGAGCCTTTGACGACC-3' ) を合成した。PCR 用装置は PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造) を用いた。ポジティブコントロールとして麹菌形質転換用プラスミド DNA を鋳型とした。ポリメラーゼは Ex Taq polymerase (宝酒造) を用いた。増幅反応は、94℃, 3 分間鋳型 DNA を変性し、94℃, 1 分間、55.5℃, 1 分間、72℃, 90 秒間保持するサイクルを 30 サイクルおこなった後、72℃, 95 秒間で完全伸長させ、4℃で保持した。得られた PCR 増幅断片をアガロースゲル電気泳動に供したところ、ポジティブコントロールと同じ位置に PCR 断片の増幅が確認され、その結果より染色体 DNA 上にグルコアミラーゼ・プロモーター配列の下流に PBS 分解酵素遺伝子が連結した塩基配列が挿入されたことと、それを有するアスペルギルス・オリゼ形質転換株が得られたことが確認された。この PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株と、挿入されていない (pNGA142 にて形質転換した) アスペルギルス・オリゼ形質転換株の孢子懸濁液を  $0.5 \times 10^6$  個孢子/ml となるようにグルコアミラーゼ・プロモーターの誘導物質であるマルトースを含む 100 ml の YPM 液体培地 {1 (w/v %) 酵母エキス, 2 (w/v %) ペプトン, 2 (w/v %) マルトース} にそれぞれ添加した。添加後 30℃, 125 rpm, 16 時間培養し、培養上清を MIRACLOTH (CALBIOCHEM (登録商標)) にて濾過することで得た。得られた培養上清に対して 0.1 (v/v %) となるように PBS 乳化液を添加し、37℃ にて保温し、その濁

度の低下 (PBS の分解) によって PBS 分解酵素の発現を確認したところ、PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみその活性の存在が認められた。次に培養上清 100  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の冷トリクロロ酢酸を加えよく混合した後、氷中で 20 分間放置し、15000 g, 4℃, 15 分間遠心分離し上清を完全に除き、沈殿画分を得た。これに 15  $\mu$ l の SDS 化溶液 {0.063 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, 2 (w/v %) SDS, 1 (v/v %) 2-メルカプトエタノール, 10 (w/v %) グリセロール, 0.05 (w/v %) ブロモフェノールブルー} を加え溶解させた後、沸騰湯浴中にて 5 分間放置し SDS 化をおこなった。これを前述の PBS 分解酵素精製標品と共に SDS-PAGE に供したところ、PBS 分解酵素遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみ PBS 分解酵素精製標品と同じ位置にタンパク質の発現が確認された (図 9)。

#### 【0096】

尚、プラスミド DNA (pNG-cut) で形質転換された生分解性プラスチック分解酵素クチナーゼ遺伝子の高発現麹菌は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1) に平成 14 年 10 月 4 日付けで寄託され、受託番号: FERM P-19054 を付与されている。

#### 【0097】

##### 【実施例 4】

(4) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌の単独培養、及び、これらの共培養によるプラスチック分解試験 (液体培養系)

ハイドロホービン高発現麹菌 (pNG-enoP-hyp) 単独、クチナーゼ高発現麹菌 (pNG-cut) 単独、コントロールとして宿主である RIB40 株にベクターのみを導入した株 (pNGA142) を実施例 1 記載の Czapek-Dox 最少培地に PBS 乳化液 0.2%, 誘導基質としてマルトース 0.5% を加えた培地に胞子を  $1 \times 10^6$  /ml で添加し 30℃ で 2 日間振盪培養した。さらにハイドロホービン高発現株とクチナーゼ高発現麹菌の共培養した試験区 (pNG-cut+pNGenoP-hyp) も設けた。培養 2 日目の培養液を MIRACLOTH でろ過して菌体を除き、培養ろ液の濁度 (630 nm で測定) の低下を表 3 に示

した。尚、初発の濁度 (OD<sub>630</sub>) は 8.73 であった。その結果、共培養株 > クチナーゼ発現株 > ハイドロホービン発現株 > コントロールの順序で濁度低下が大きかった。

【0098】

【表3】

Strain	残存乳化PBS 濁度 (OD <sub>630</sub> )
Control (pNGA142)	4.99
pNG-cut+pNG-enoP-hyp	1.53
pNG-cut	3.26
pNG-enoP-hyp	4.16

【0099】

【実施例5】

(5) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌の単独培養、及び、これらの共培養によるプラスチック分解試験 (固体培養系)

実施例4で用いたそれぞれの菌株を  $1 \times 10^7$  孢子個/ml に調整し、0.5% (w/v) のPBS粉末を懸濁した最小培地 (0.5% マルトース) に接種して、30℃で8日間培養した。培養後、菌体を取り込んでいるPBS微細粉末を洗浄 (菌体を50mlファルコンチューブに取り25ml程度の滅菌水を加えボルテックスミキサーで攪拌) し、菌体とPBS微細粉末を完全に分離した。洗浄液をミラクロスろ紙で濾過し、濾液を遠心 (10,000rpm15min) 後、上清を除き初期培養条件の液量になるように最小培地で調整し懸濁させた。その懸濁液を300倍希釈し630nmで吸光度を測定した。得られた結果を表4に示す。

これらの結果から、ハイドロホービン高発現株、クチナーゼ高発現株共に、宿主のRIB40株に比較して、粉体の固形PBSにおける生育も著しく増加し、PBSの転換能が向上していることが確認された。

【0100】

【表 4】

Strain	残存固体PBS 濃度 (OD <sub>630</sub> )	分解率
Control (pNGA142)	0.893	7.7%
pNG-eno-hyp	0.717	28%
pNG-cut	0.519	46%
pNG-cut + pNG-eno-hyp	0.243	75%

## 【0101】

## 【実施例 6】

(6) 麹菌アスペルギルス・オリゼ ハイドロホービン高発現菌、クチナーゼ高発現菌、及び、有用物質の生合成系に關与する酵素（有用物質）を高発現菌の共培養による有用物質の製造

次いで生分解性プラスチックPBSの分解に共役した、有用物質生産の例として工業用酵素 $\alpha$ -アミラーゼの生産を行った。実施例 4 と同様の培地を用いて、クチナーゼ高発現株 (pNG-cut 組み換え体) とハイドロホービン高発現株 (pNG-enoP-hyp) の共培養、クチナーゼ高発現株 (pNG-cut 組み換え体) とハイドロホービン高発現株 (pNG-enoP-hyp) と $\alpha$ -アミラーゼ高発現株 (pNG-amy) の共培養を行った。コントロールとして pNGA142 のインサートを持たないベクターのみを有する RIB40 株を用いた。pNG-amy を保持する RIB40 形質転換体は、麹菌 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (S. Tada et al.: Agric. Biol. Chem., 53, 593-599 [1989]) をクチナーゼ遺伝子同様に pNGA142 に挿入して作製し、RIB40 株を形質転換して得た。実施例 4 の実験と同様に、培地に  $1 \times 10^6$  個の胞子を接種し、30℃で2日間培養した。培養液を MIRA CLOTH でろ過して菌体を除き、培養ろ液を得、15000 g, 4℃, 10 分間遠心分離し残存する PBS を完全に除き培養上清を得た。

## 【0102】

$\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、培養上清を水にて 100 倍に希釈したものを用いた。各培養上清中の $\alpha$ -アミラーゼ活性発現量はヨウ素呈色法にて測定した。測定用試薬溶液として、A 液; 50 mM トリス緩衝液 (pH 6.8) 中に可溶性澱粉を 0.3 % となるように溶かしたもの、B 液; 1 N 塩酸中にヨウ素を  $2 \times 10^{-4}$  %、ヨウ化カリウムを  $2 \times 10^{-3}$  % になるように溶かしたものを調製した。A 液 400  $\mu$ l

に 50  $\mu$ l の希釈した培養上清を加え 37℃で 10 分間反応させた。そこに B 液を 50  $\mu$ l 加え、よく混合し、直ちに 620 nm の吸光度を測定し、Blank (未接種) の値に比した吸光度の減少量を  $\alpha$ -アミラーゼの相対活性量として 表5 に示した。PBS減少量は三重共培養株=二重共培養株>コントロールの順序で大きかった。 $\alpha$ -アミラーゼ活性誘導は三重共培養株>二重共培養株>コントロールの順序で大きく、PBS分解で供給されるPBSモノマーをエネルギー源として、三重共培養区では工業用  $\alpha$ -アミラーゼ生産されることが明らかになった。

【0103】

【表5】

Strain	残存PBS濁度 (OD <sub>630</sub> )	$\alpha$ -amylase相対活性 ( $\Delta$ OD <sub>620</sub> )
Blank (未接種)	10.44	0
Control (pNGA142)	3.18	0
pNG-cut+pNG-enoP-hyp	0.47	0.020
pNG-cut+pNG-enoP-hyp+pNG-amy	0.36	0.134

【0104】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> TOHOKU TECHNOARCH CO. LTD., National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Method for the Production of Useful Products by means of Decomposition of Plastics by Microorganisms

<130> AB02029

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 497

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(453)

<400> 1

atg cag ttc tcc gtc gcc gct gtt ctt gct ctg gct act gcc gtt gcc	48
Met Gln Phe Ser Val Ala Ala Val Leu Ala Leu Ala Thr Ala Val Ala	
1                      5                      10                      15	
gct ctt cct cct gcc tct ggc act ggc gct ggc cag caa gtc gga cac	96
Ala Leu Pro Pro Ala Ser Gly Thr Gly Ala Gly Gln Gln Val Gly His	
20                      25                      30	
tcc aag aac gac ttc cct ctc cct aag gag ttg acc acc aag cag gcc	144
Ser Lys Asn Asp Phe Pro Leu Pro Lys Glu Leu Thr Thr Lys Gln Ala	
35                      40                      45	
gcc gac aag tgt ggt gac cag gct cag ctc acc tgc tgc aac aag acc	192
Ala Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Thr Cys Cys Asn Lys Thr	
50                      55                      60	
gtc aag acc ggt gac ttc acc cag gtt gag gag ggt ctc ctt gct ggc	240
Val Lys Thr Gly Asp Phe Thr Gln Val Glu Glu Gly Leu Leu Ala Gly	
65                      70                      75                      80	
ctc ctc tcc aac ctc ctc ggt gcc gga cag ggc tcc cag ggt ctt ggt	288
Leu Leu Ser Asn Leu Leu Gly Ala Gly Gln Gly Ser Gln Gly Leu Gly	
85                      90                      95	
ctc ttg gat gag tgc acc aac atc cct gtt atc ccc atc atc tcc atc	336
Leu Leu Asp Glu Cys Thr Asn Ile Pro Val Ile Pro Ile Ile Ser Ile	
100                      105                      110	
gcc tct cct cag gag aag tgc aag cag ccc atc tct tgc tgc cag aac	384
Ala Ser Pro Gln Glu Lys Cys Lys Gln Pro Ile Ser Cys Cys Gln Asn	
115                      120                      125	
acc aag tcc agc gcc gat ggc gac ctc gtc ggt att ggt ctt cct tgc	432

Thr Lys Ser Ser Ala Asp Gly Asp Leu Val Gly Ile Gly Leu Pro Cys  
 130 135 140  
 atc gct ctc ggc tct ctc ctg taagcgattg cattcgcgaa aatggtagct 483  
 Ile Ala Leu Gly Ser Leu Leu  
 145 150  
 cgaggagcac ggga 497

### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 *A. oryzae* 等のアスペルギルス属糸状菌がPBS転換能力を持つことを確認した写真である。

【図 2】 *A. oryzae* が P L A 転換能力を持つことを確認した写真である。

【図 3】 DNA マイクロアレイ解析用の培地の組み合わせを示す。

【図 4】 P B S 存在時に特異的に発現する遺伝子群を模式的に示す。

【図 5】 Su3PP5、Su3PE5、Su3Bu5 の DNA マイクロアレイの結果を視覚的に解析した結果であり、各数字は、遺伝子発現を (C y 5 / C y 3) の比で表わしている。

【図 6】 ハイドロホービンの完全長を含む JZ3981 の塩基配列を示す。

【図 7】 麹菌用 ハイドロホービン高発現プラスミドの構築を示す模式図である。

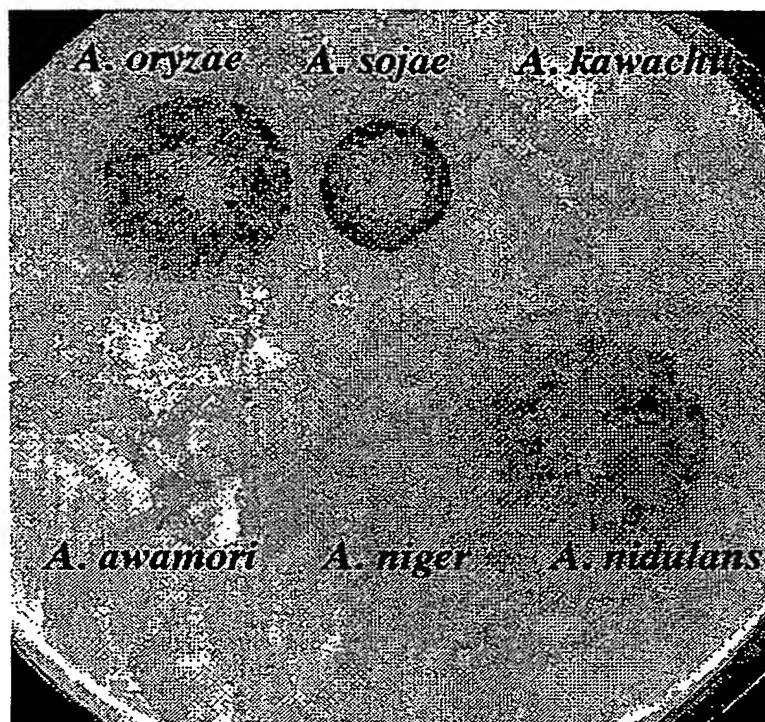
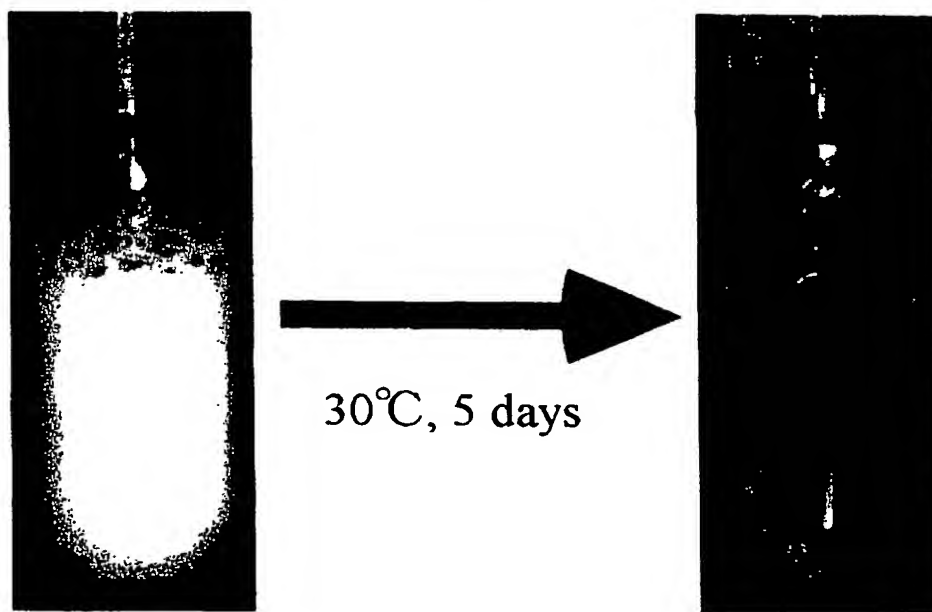
【図 8】 ハイドロホービン高発現麹菌が高度に ハイドロホービンを培養上清に分泌していることを示すゲル電気泳動 (S D S - P A G E) の写真である。

【図 9】 PBS 分解酵素であるクチナーゼ遺伝子が染色体 DNA 中に挿入されたアスペルギルス・オリゼ形質転換株の培養上清中にのみ PBS 分解酵素精製標品と同じ位置にタンパク質が発現していることを示すゲル電気泳動 (S D S - P A G E) の写真 (左)、及び該形質転換株による P B S の分解を示す写真 (右) である。

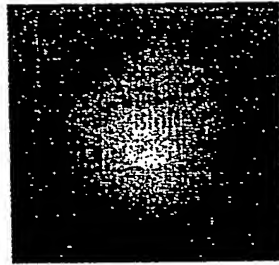


【書類名】 図面

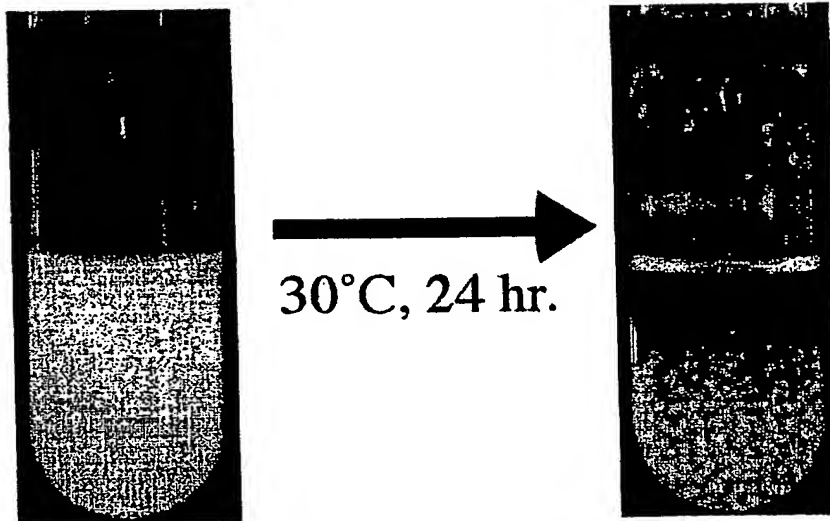
【図1】

(A) PBS エマルジョン 最少寒天培地上でのHalo 形成(B) PBS 最少液体培地の濁度低下

【図 2】

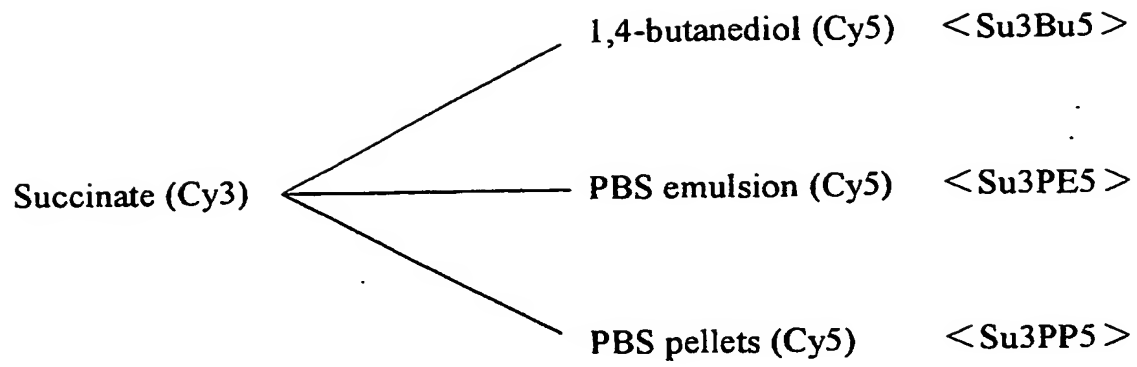


(A) PLA エマルジョン最少寒天培地上での Halo 形成

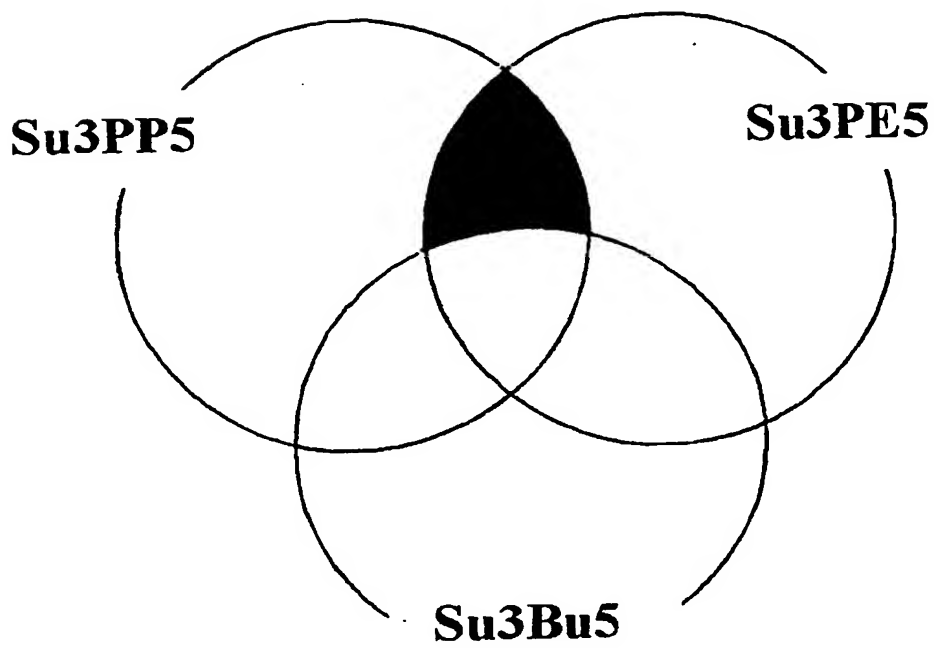


(B) PLA 最少液体培地の濁度低下







【図 3】



【図 4】



【図 5】

GENE	Su3PP5	Su3PE5	Su3Bu5
JZ3981 hydrophobin	 9.11	 18.0	 1.27
Histone	 0.86	 1.01	 1.03

【図 6】

**CCAGAACAATTGGCTGCCCTAGTCTGTGCACCTGAACCAACGCTCATTCACCTCTTCACAGTTCAGTCTTCTTCTCCAAAG**

ACAAGCTTCTCTCGCTTACAAACTTCTCCGAGTCTACCCCTCGTTCAAAACCAAGCCACCATCACAAATGCAGTTC  
M Q F

TCCGTCGCCCGCTGTCTTGCCTCTGGCTACTGCCGTTCCTCCTCTGCCTCTGGCACTGGCGCTGGCCAG

Q V G H S K N D F P L P K E L T T K Q A A D K C G.  
CAAGTCGGACACTCCAAGAACGACTTCCCTCTCCCTAAGGAGTTGACCAACCAAGCAGGCCGCCGACAAAGTGTGGT

D Q A Q L T C C N K T V K T G D F T Q V E E G L L L  
GACCAGGCTCAGCTCACCTGCTGCAACAAGACCGTGACCTCACCCAGGTTGAGGAGGGTCTCCTT

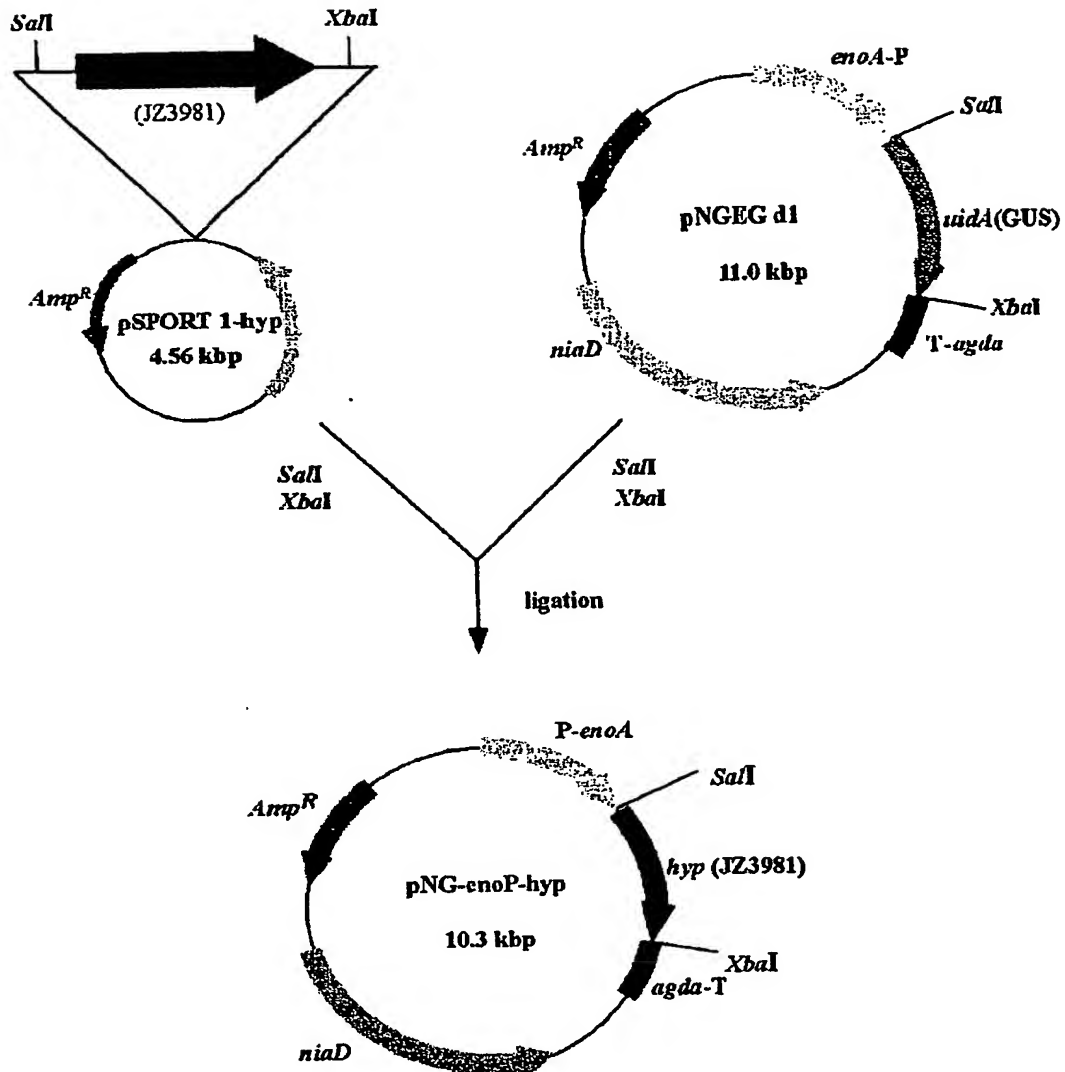
GCCTGGCCCTCTCCAACTCTCGGTGCCGGACAGGGCTCCAGGGTCTTGGTCTCTTGGATGAGTGACCAAC  
A G L L S N L L G A G Q G S Q G L G L D E C T N

ATCCCTGTTATCCCCATCATCTCCATCGCCCTCTCCTCAGGAGAGTGCAAGCAGCCCATCTCTTGCCTGCCAGAAC  
I P V I P I I S I A S P Q E K C K Q P I S C C Q N

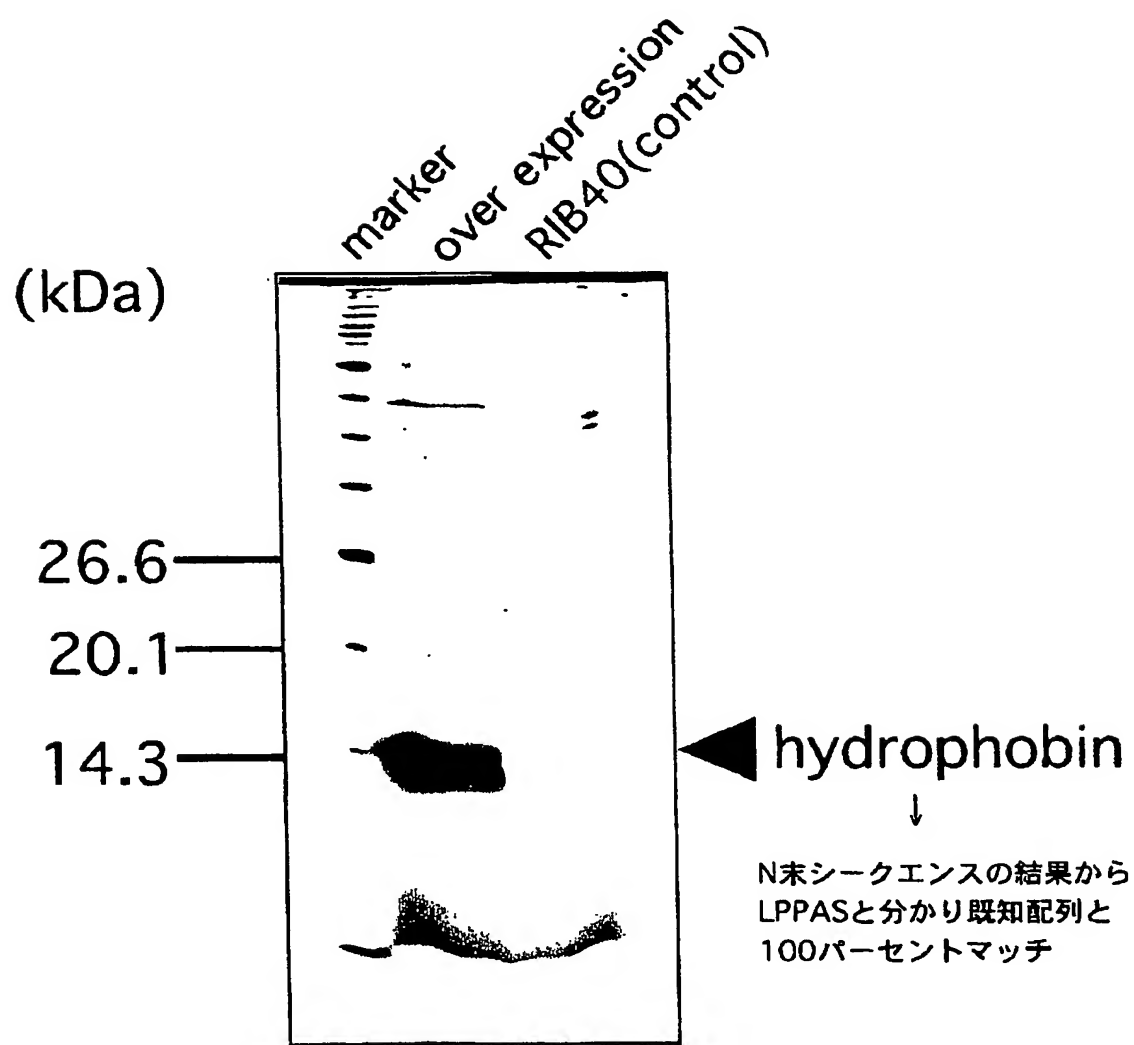
ACCAAGTCCAGCGCGATGGCGACCTGTCGGTATTGGTCTTCCITGCATCGCTCTCGGCTCTCTCTCTGTAAGCG  
T K S S A D G D L V G I G L P C I A L G S L L \*

**ATTGCA TTGGCGAA AATGGTAGCTCGAGGAGCACGGGA**

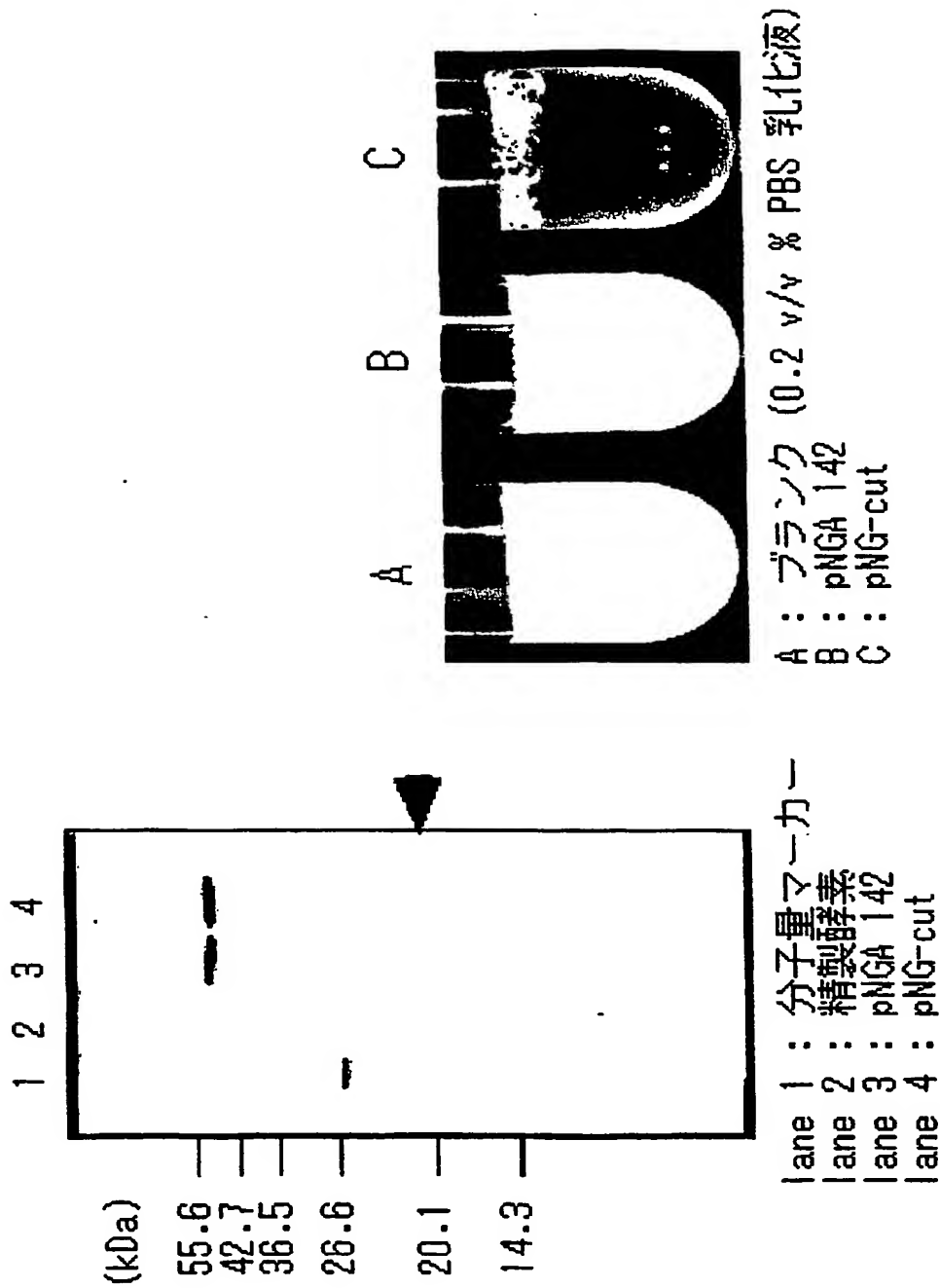
【図 7】



【図 8】



【図9】



SDS-PAGE

PBS 分解活性の検定



**【書類名】 要約書**

**【課題】** バイオサーファクタントのような界面活性物質とプラスチック分解酵素を生産する微生物あるいは界面活性物質及びプラスチック分解酵素そのものを活用することで、高密度のプラスチックの大規模分解を効率的に進行させることに加えて、酵素タンパク質や抗生物質などの有用物質生産性の高い微生物（糸状菌や放線菌）を用いて、有用物質の生産も同時に行うことができる新規な方法を提供すること。

**【解決手段】** プラスチックにアスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤを接触させ、アスペルギルス・オリゼ又はアスペルギルス・ソーヤの作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解し、更に、分解されたプラスチックの成分を微生物により転換することから成る、プラスチックから有用物質を製造する方法、及び、バイオサーファクタント及び／又はプラスチック分解酵素の共存下で、プラスチックに微生物を接触させ、微生物の作用によりプラスチックを分解することから成る、プラスチックを分解する方法、並びに、界面活性物質をコードする遺伝子を含むDNA、プラスチック分解酵素をコードする遺伝子を含むDNA、及び有用物質をコードする遺伝子を含むDNAから選択される少なくとも一つ以上のDNAによって組換えられた形質転換菌。

**【選択図】 図1**

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-308884
受付番号	50201598438
書類名	特許願
担当官	小池 光憲 6999
作成日	平成15年 1月15日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年10月23日

次頁無

特願 2002-308884

出願人履歴情報

識別番号

[899000035]

1. 変更年月日

1999年 9月16日

[変更理由]

新規登録

住 所

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉468番地

氏 名

株式会社 東北テクノアーチ

特願2002-308884

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**